



Alicia Izquierdo Pascual

*"ESTEROIDES PLASMATICOS Y SUS POSIBLES RITMOS BIOLOGICOS
EN EL SEMENTAL DE PURA RAZA ESPAÑOLA"*

Departamento de Fisiología Animal
Departamento de Patología Animal II
Universidad Complutense de Madrid
1996

"ESTEROIDES PLASMATICOS Y SUS
POSIBLES RITMOS BIOLOGICOS EN EL
SEMENTAL DE PURA RAZA ESPAÑOLA"

MEMORIA que para la colación
del grado de Doctor, presenta
la Licenciada en Veterinaria
Dña. Alicia Izquierdo Pascual

ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA BAJO
LA DIRECCION DE:



Prof. Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal.

Prof. Dr. D. Jose Félix Pérez



Licenciada Dña. Alicia Izquierdo
Pascual, aspirante al grado de Doctor
en Veterinaria.



Madrid, Marzo, 1996

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de tanto tiempo han tenido oportunidad de ayudarme tantos amigos que espero no olvidarme de nadie, y si así fuera, que no me lo tuvieran en cuenta. Quiero agradecer a todas las personas que me han prestado su apoyo, que no son pocas, y me han dado ánimos para poder llevar a cabo esta Tesis:

- A mis directores de Tesis, Juan Carlos Illera del Portal, Prof. Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la UCM, por el tiempo que me ha dedicado y que me ha "soportado" cuando las cosas no salían como yo quería; y a Jose Félix Pérez Gutiérrez, Prof. Titular del Departamento de Patología Animal II, que fue quien me facilitó el camino para poder realizar este trabajo.
- Al Prof. Dr. D. Mariano Illera Martín, Catedrático Director del Departamento de Fisiología Animal, por haber puesto a mi alcance los medios necesarios para llevar a cabo esta "empresa".
- A Prof^a. Dra. D^a. Ana Portela Arteaga, que con sus profundos conocimientos sobre Cronofisiología, me ha aclarado una gran cantidad de dudas.
- Quiero darles las gracias a May (quien me enseñó a hacer placas), Gema, Blassi, Pedro, M^a del Mar y Luis, por madrugar conmigo y ayudarme en el trabajo de laboratorio; así como a M^a José por prestarme el ordenador y resolver mis dudas de ortografía.
- A José Nicolás Chicote (Veterinario) a quien faltó tiempo para buscar animales para mi estudio; de igual forma que, a la familia Gil (Finca Valdeolivas) por prestar tan maravillosos ejemplares para la realización de esta Tesis.
- A mis compañeras Concepción García Botey, Prof^a. Titular del Departamento de Patología Animal II y a Ana M^a Mayenco Aguirre, Prof^a. Asociada del mismo, por quienes empecé en este camino tan sufrido de la investigación.

- Por último, aunque no menos importante, a mi familia: David, que aunque no tiene la licenciatura en Veterinaria, es casi un experto en el trabajo de campo y de laboratorio; y mis padres y hermanos, a los que también les ha tocado trabajar en esto.

INDICE

INDICE

OBJETIVO.....	2 - 3
----------------------	--------------

INTRODUCCIÓN.....	4 -28
--------------------------	--------------

FISIOLOGIA DEL TESTICULO

ESTEROIDOGENESIS EN EL TESTICULO

ESTEROIDOGENESIS EN LA CORTEZA ADRENAL

CRONOBIOLOGIA: RITMOS BIOLOGICOS

MATERIAL Y METODOS.....	30 - 46
--------------------------------	----------------

ANIMALES

TOMA DE MUESTRAS

DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES HORMONALES

VALIDACION DE LA TÉCNICA

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

RESULTADOS.....	48 - 76
------------------------	----------------

DILUCIONES OPTIMAS DE ANTICUERPO

DILUCIONES OPTIMAS DE CONJUGADO

VALIDACION DEL EIA DE COMPETICION PARA LAS HORMONAS
ESTEROIDES (TESTOSTERONA, 17 β -ESTRADIOL Y CORTISOL)

CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE TESTOSTERONA, 17 β -
ESTRADIOL Y CORTISOL A LO LARGO DEL AÑO

CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE TESTOSTERONA, 17 β -
ESTRADIOL Y CORTISOL A LO LARGO DE LA SEMANA

CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE TESTOSTERONA, 17 β -
ESTRADIOL Y CORTISOL A LO LARGO DEL DIA

DISCUSION	78 - 94
------------------------	----------------

CONCLUSIONES	96 - 97
RESUMEN	99 - 100
BIBLIOGRAFIA	102 - 127

ACRONIMOS

a.m.	Ante-meridiano
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AD	Androstenodiona
BMDP	Biomedical data program
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
C	Hormona cortisol
CV	Coeficiente de variación
DHEA	Deshidroepiandrosterona o dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
D.S.	Desviación estándar
EIA	Enzimoinmunoanálisis
ELISA	Enzimo linked immunoassay
E ₂	Hormona 17β-estradiol
E.S.	Error estándar
FAD	Dinucleótido de adeni-flavina
FC	Frecuencia cardíaca
FMN	Mononucleótido de flavina
FSH	Hormona foliculo estimulante
GTP	Trifosfato de guanosina
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HRP	Peroxidasa de rábano picante
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
LO	Luz-oscuridad
LMH	Lóbulo medio de la hipófisis
LPH	Lóbulo posterior de la hipófisis
OHSD	Enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
OPD	Ortofenilén-diamina dihidroclorhidrato
P450	Enzima citocromo P450
p.m.	Post-meridiano
PS	Presión sanguínea
ng/ml	Nanogramos por mililitro
pg/ml	Picogramos por mililitro

RIA	Radioinmunoanálisis
SCC	Sistema enzimático fragmentador de la cadena lateral
SCP	Sterol carrier protein (proteína transportadora)
τ	Período
T	Hormona testosterona
UCM	Universidad Complutense de Madrid

OBJETIVO

El caballo es un animal altamente fotorreceptivo, de tal forma que ligeras variaciones en la cantidad de luz producen grandes variaciones, en las concentraciones plasmáticas de las hormonas reguladoras de la función reproductora. Con el desarrollo, en los últimos años, de técnicas enzimoimmunoanalíticas se han podido determinar las concentraciones de los diferentes perfiles hormonales. En el caballo, se han realizado múltiples estudios sobre los niveles plasmáticos de testosterona y cortisol, en distintas latitudes y en distintas razas; así como trabajos sobre los niveles plasmáticos de 17β -estradiol en los que los resultados reflejan un margen amplísimo de concentraciones.

Al no existir ningún trabajo que describiera los niveles plasmáticos de los sementales de Pura Raza Española, considerándolos no sólo como una de las razas autóctonas españolas fundamentales, sino también como una de las principales razas caballares a nivel mundial, hemos creído conveniente estudiar los perfiles hormonales de testosterona, 17β -estradiol y cortisol, con el objeto de contribuir a su clarificación y dejar establecidas algunas de las constantes fisiológicas de esta raza.

Para completar nuestro trabajo, hemos creído necesario el hacer una revisión bibliográfica con los siguientes objetivos: la fisiología y la esteroidogénesis a nivel testicular, la esteroidogénesis a nivel adrenal, y por último una revisión de la cronofisiología, como ciencia encargada del estudio de ciclos hormonales predecibles en el organismo.

Estudiamos la posible ritmicidad en la secreción de testosterona, 17 β -estradiol y cortisol a lo largo del año, de la semana y del día.

Asimismo, quisimos comprobar las diferencias ó similitudes existentes entre los patrones de las tres hormonas y las posibles diferencias entre las concentraciones obtenidas a lo largo del día en dos épocas del año.

INTRODUCCION

FISIOLOGIA DEL TESTICULO

Los testículos del semental se encuentran situados en la región prepúbica con su eje longitudinal casi en posición vertical. Poseen forma ovoide y están comprimidos laterolateralmente, con una longitud de 80 a 140 mm, una anchura de 50 a 80 mm y un peso alrededor de los 225 g, variando según la edad y la estación. El parénquima testicular ocupa el 90% del total de la masa testicular decreciendo con la edad y posee dos componentes básicos, los túbulos seminíferos y el intersticio, dentro de los cuales encontramos las células responsables de la esteroidogénesis: las células de Leydig y las células de Sertoli (Varner *et al.*, 1991).

La testosterona se sintetiza en las células de Leydig que se localizan en el intersticio de los túbulos seminíferos. Según Almahbobi *et al.* (1988), la habilidad esteroidogénica del caballo se relaciona con la calidad y cantidad de tejido intersticial, y Berndtson y Jones (1989) afirman que se encuentra relacionada con la edad. El otro tipo celular del testículo, las células de Sertoli, puede sintetizar y secretar asimismo algunos andrógenos (Hall, 1988).

Los nombres utilizados para designar las hormonas esteroides secretadas en el testículo son (figuras 1 y 2):

- * Androstenediol (3β , 17β -dihidroxi Δ^5 -androsteno)
- * Androstenediona (3,17-diceto Δ^4 -androsteno)
- * Dihidrotestosterona (17 β -hidroxi-5 α androsten-3-ona)
- * Estradiol (estra-1,3,5(10)-trieno-3 β ,17 β -diol).
- * Estrona (3 β -hidroxiestra-1,3,5(10)-trieno-17-ona)
- * Testosterona (17 β -hidroxi-androst-4-en-3-ona)

La mayoría de los andrógenos secretados por el testículo son sintetizados en las células de Leydig; cualquier contribución hecha por los túbulos seminíferos es menos importante (Eik-Nes y Hall, 1965; Christensen y Manson, 1965). Según Tamaoki (1973), los andrógenos testiculares son producidos por las células intersiciales del tejido testicular,

pero no por las células encargadas de la espermatogénesis.



Figura 1.- Esteroides testiculares



Figura 2.- Esteroides testiculares

El agente regulador más importante en la síntesis de andrógenos es la hormona luteinizante (LH), la cual es secretada a pulsos por la adenohipófisis (Dierschke *et al.*, 1970) y ejerce su acción al unirse a su receptor. Parece que la gonadotropina coriónica humana (hCG) es también capaz de unirse a este receptor obteniéndose la misma respuesta en las células efectoras.

Las células de Leydig sintetizan y secretan, constantemente, testosterona (Dadoune y Demoulin, 1993), además de otras hormonas. Estas células se estimulan periódicamente y aumentan su producción, de forma que podemos encontrar un aumento en la concentración de testosterona cada 2 a 4 horas (Ewing y Brown, 1977).

Según Amann (1993b), durante la producción episódica de testosterona en el semental, la concentración, en el interior del testículo, es 10 veces superior a la concentración basal, como consecuencia, los tubos seminíferos parecen estar continuamente expuestos a concentraciones elevadas de testosterona, necesarias para un normal funcionamiento de la espermatogénesis.

El fluido intersticial posee una concentración total de 17β -hidroxiandrógenos, 45 veces mayor que la que podemos encontrar en el suero obtenido, por punción, de la vena yugular (Amann y Ganjam, 1981 y Seamans *et al.*, 1991). Cuando las células de Leydig están bajo la máxima estimulación de LH, la concentración de testosterona, en la vena testicular, puede doblar 100 veces la concentración de testosterona, en la vena yugular (Amann y Ganjam, 1981).

El testículo también es capaz de sintetizar estrógenos (Nyman *et al.*, 1959); tanto las células de Leydig como las de Sertoli son responsables de esta síntesis en los machos (Robel, 1993a). La biosíntesis puede producirse vía Δ^4 ó Δ^5 , aunque la mayoría de la biosíntesis de esteroides parece ocurrir vía Δ^4 (vía progesterona), pero no se tienen datos acerca del tipo de células responsables (Sertoli, Leydig o algún otro componente del testículo, Pickett *et al.*, 1989) de la producción de estrógenos en el testículo del semental.

La vena testicular contiene altas concentraciones de estrona y estradiol, la mayoría en forma conjugada con sulfato (o glucurónido), para aumentar la solubilidad en agua y perder bioactividad. Aunque no se conoce bien el papel biológico de estos estrógenos conjugados producidos en el testículo. La administración de estradiol a caballos castrados fue capaz de restaurar la libido, pero no influyó sobre el peso de los órganos sexuales accesorios ni fue capaz de restaurar la habilidad para eyacular en los animales castrados; por

lo que parece que el estradiol está envuelto en la estimulación del comportamiento sexual, a nivel neural central pero no parece afectar al tracto genital del semental (Nett, 1993a).

En adición a la estrona y estradiol, el testículo además secreta estriol y otros dos estrógenos identificados por primera vez en el caballo, la equilina y la equilenina (figura 3).

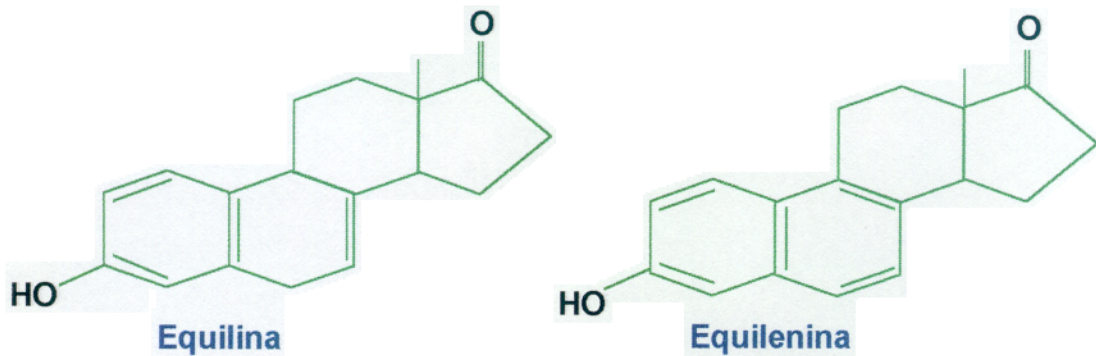


Figura 3

ESTEROIDOGENESIS EN EL TESTICULO

Los factores que influyen en la esteroidogénesis son la especie, el sexo, la edad, el estado de desarrollo (feto, recién nacido, inmaduro, maduro, senil) y las condiciones fisiológicas tales como estación reproductora, estrés, etc. (Tamaoki, 1973).

La síntesis de andrógenos por las células de Leydig y los mecanismos de regulación de este proceso (figura 4), no se conocen bien a pesar de los múltiples estudios realizados. Cada nuevo descubrimiento abre nuevas perspectivas, pero aumenta la complejidad del problema.

Todas las hormonas esteroides son sintetizadas, en su totalidad, por el organismo

y derivan del sistema anular ciclopentanoperhidrofenantreno que consiste en tres anillos hexagonales, A, B y C; y un cuarto anillo pentagonal, D. Por sustitución de grupos metilo, se obtienen los cuatro grupos de hormonas esteroides relacionadas con la reproducción: progestágenos, andrógenos, estrógenos y corticosteroides (Carruthers, 1986).

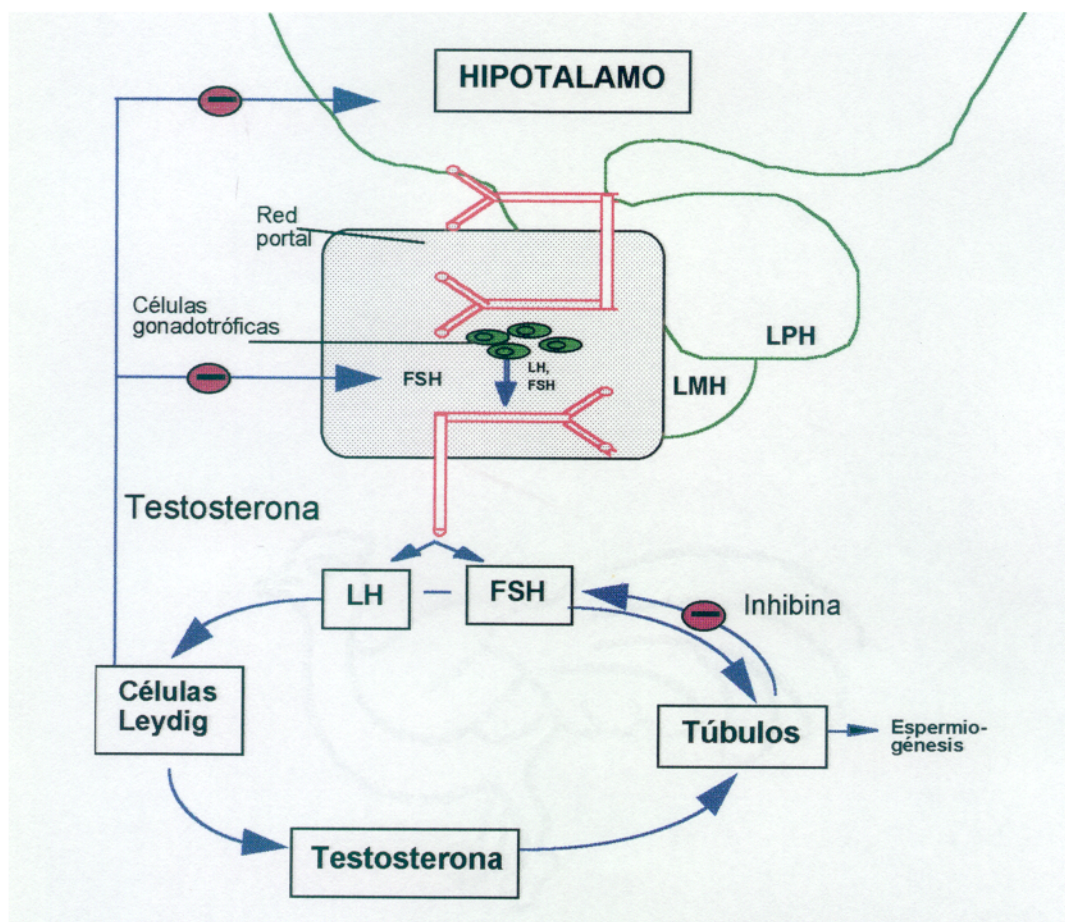


Figura 4.- Regulación de la producción de testosterona

Silván e Illera (1994) describen la síntesis de colesterol de la siguiente manera:

- Conversión de tres moléculas de acetato en ácido mevalónico,
- Conversión de seis moléculas de ácido mevalónico en escualeno
- Oxidación y ciclación del escualeno en lanosterol

- d) Eliminación de tres grupos metilo del lanosterol y ordenamiento de dobles enlaces para la obtención de la molécula de colesterol.

El colesterol esteroideogénico es aportado, en parte, por síntesis *de novo* a partir de acetato, por almacenamiento intracelular en vacuolas, y en parte, por el colesterol importado desde el plasma, en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Esta proporción varía según el tipo de célula (adrenal o de Leydig), la especie y el estado fisiológico (Hall, 1993).

La captación de lipoproteínas sanguíneas, portadoras de colesterol, es la principal fuente para la síntesis de hormonas gonadales, aunque en el testículo esta evidencia no es tan clara. La captación de las lipoproteínas está regulada hormonalmente y coordinada con la síntesis intracelular de colesterol, así como con la hidrólisis de los ésteres de colesterol, con el fin de asegurar que existe una concentración idónea de colesterol para la esteroideogénesis (Gore-Lagton y Armstrong, 1988). Las LDL se unen a receptores específicos de membrana, una vez producida la unión lipoproteína-receptor, se lleva a cabo una endocitosis por degradación lisosómica, mediada por el propio receptor (Niswender, 1993). Se conoce que la hormona adrenocorticotropa (ACTH) promueve la entrada de LDL al interior de la célula adrenal (Hall y Nakamura, 1979), pero se desconoce si la LH podría tener el mismo papel a nivel de las células de Leydig.

Después de su paso a la célula, el colesterol es, en gran parte, esterificado (en forma de oleato) y almacenado en vacuolas citoplasmáticas, las cuales decrecen en tamaño y número cuando las células de Leydig son estimuladas por la LH. En condiciones normales, el colesterol captado del plasma es inmediatamente utilizado para la síntesis de hormonas. Cuando se necesita colesterol para la síntesis de esteroides, el éster es hidrolizado a colesterol libre gracias a la colesterol éster hidrolasa, localizado en las células de Leydig (Albert *et al.*, 1980).

Las células de Leydig, bajo la influencia del cAMP, emplean parte de sus reservas biológicas para aumentar la síntesis de andrógenos. Estas células crean nuevas proteínas que

no han sido catalogadas y cuyas funciones aún no están claras. Algunas de estas proteínas y otras, existentes en la célula, sufren fosforilaciones a la vez que se producen cambios en el contenido celular de fosfolípidos, cambios posiblemente debidos a la síntesis mitocondrial de pregnenolona.

El transporte de colesterol hacia la mitocondria y dentro de la mitocondria, desde su membrana externa a la interna, se realiza con la ayuda de proteínas transportadoras (SCP o sterol carrier protein) (Chanderbahl *et al.*, 1982; Vahouny *et al.*, 1983). El primer paso envuelve a microfilamentos y filamentos intermedios que han sido hallados en células de Leydig de ratas (Almahbobi *et al.*, 1993). El paso de colesterol de las vacuolas lipídicas, que almacenan colesterol esteroidogénico, a las mitocondrias en las que se lleva a cabo la síntesis de pregnenolona, se realiza mediante esos filamentos intermedios.

La mayoría de las enzimas que regulan la síntesis de hormonas esteroides son enzimas citocromo P450, que catalizan reacciones de hidroxilación. Estas enzimas se localizan a nivel de la mitocondria y a nivel de los microsomas del retículo endoplasmático (Samuels y Matsumoto, 1974) y pertenecen al sistema multienzimático denominado SCC (side chain cleavage ó sistema enzimático fragmentador de la cadena lateral):

- 1.- En la mitocondria: utilizan dinucleótido de adenina flavina (FAD) y una proteína llamada testodoxina que contiene hierro y oxígeno molecular (Berne y Levy, 1992; Hall, 1993). En este grupo se incluye la citocromo P450_{scc} (Robel, 1993).
- 2.- En los microsomas: utilizan FAD y mononucleótido de flavina (FMN). Se cree que, el citocromo b₅, está implicado en la reducción de la P450 en los microsomas. En este grupo incluimos la P450_{C17} y la P450_{aro} (aromatasa).

La testosterona se sintetiza a partir del colesterol por cuatro reacciones enzimáticas, catalizadas por cuatro enzimas (figura 5). Dos de estas enzimas, la P450_{scc} y P450_{C17} son monoxigenasas que utilizan oxígeno atmosférico como sustrato y se reducen por

nucleótidos piridínicos. Para llevar a cabo su función catalítica, la enzima debe ser

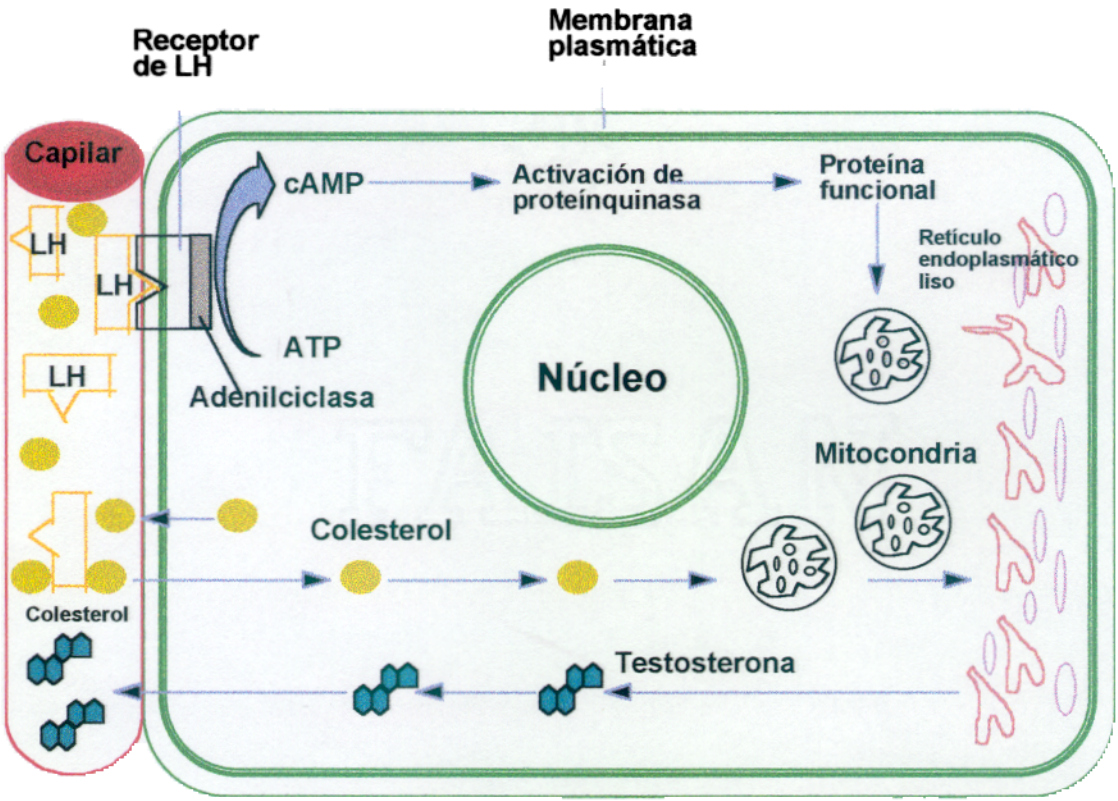


Figura 5.- Síntesis de testosterona

reoxidada para continuar actuando sobre nuevas moléculas de sustrato. Estas dos enzimas eliminan la cadena lateral del colesterol en dos pasos oxidativos. Las otras dos enzimas son deshidrogenasas que emplean nucleótidos piridínicos, una de las cuales, la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ 4,5 isomerasa, cataliza la isomerización en el anillo A y B

El cAMP estimula la síntesis de andrógenos acelerando el transporte de colesterol desde los depósitos lipídicos del citosol hacia la enzima citocromo P450_{sc}. La LH y el cAMP promueven la síntesis de P450_{sc} y P450_{C17} en células de Leydig de ratas (Anderson y Mendelson, 1985; Nishihara *et al.*, 1988) influyendo en la transcripción genética de las mismas

Las cuatro reacciones enzimáticas necesarias para obtener testosterona son:

- 1ª El colesterol debe perder la cadena lateral, mediante escisión enzimática de 6 átomos de carbono, a nivel del carbono 17 y sufrir una reorganización de los anillos A y B.
- 2ª La oxidación del grupo 3β de la pregnenolona a grupo cetona y la reorganización de los dobles enlaces.
- 3ª Eliminación del resto de la cadena lateral en el C17.
- 4ª Reducción de la cetona del C17 a 17βol.

La eliminación de la cadena lateral en el C17 del colesterol tiene lugar en dos pasos. El primer paso es una hidroxilación que prepara a los carbonos C20 y C22 para la ruptura (segundo paso). La reacción tiene lugar en la mitocondria obteniéndose pregnenolona e isocaproaldehído:



El resto de la cadena lateral, en el C17, se elimina para producir esteroides C19 y dos átomos de carbono, por acción de la enzima P450_{C17}. Esta enzima se localiza en la fracción microsomal y cataliza el paso de pregnenolona a 17α-hidroxipregnenolona y el paso de progesterona a 17α-hidroxiprogestero, gracias a su actividad hidroxilasa.

A partir de aquí, la biosíntesis de testosterona puede seguir dos rutas metabólicas:

- a.- Ruta Δ4: paso de 17α-hidroxiprogestero a androstenodiona.
- b.- Ruta Δ5: paso de 17α-hidroxipregnenolona a androstenodiol.

Ambas reacciones están catalizadas por la enzima anterior, gracias a su actividad liasa.

El predominio de una ruta u otra no se produce al azar, difiere según la especie. En la rata macho predomina la $\Delta 4$; en el cerdo, en el conejo y en el perro (Hall, 1993) la $\Delta 5$, casi exclusivamente. En el caballo se desconoce qué ruta es la que predomina. El predominio puede deberse a la especificidad diferencial de la P450_{c17} y la deshidrogenasa/isomerasa por uno o ambos sustratos y a la organización de las enzimas en la membrana.

La oxidación del grupo 3 β de la pregnenolona a grupo cetona y la reorganización de los dobles enlaces son catalizadas por la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta 4,5$ isomerasa. Esta enzima actúa sobre cuatro sustratos: pregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona, dehidroepiandrosterona y androstenodiol para obtener progesterona, 17 α -hidroxiprogestero, androstenodiona y testosterona, respectivamente (Sun Choi, 1987; Thomas *et al.*, 1988; Berne y Levi, 1992). Estos productos inhiben, competitivamente, la acción enzimática. La enzima se localiza en la mitocondria y en la fracción microsomal en, aproximadamente, la misma proporción.

El último paso incluye la reducción de la cetona del C17 a 17 β ol de la testosterona. La enzima microsomal 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (OHSD) cataliza la conversión de la androstenodiona, dehidroepiandrosterona y estrona a testosterona, androstenodiol y 17 β -estradiol, respectivamente (Sun Choi, 1987; Berne y Levy, 1992).

La reacción catalizada es reversible y muestra la propiedad inusual de activación del producto, esto es, la testosterona, por ejemplo, promueve su propia formación desde androstenodiona y viceversa (Oshima y Ochi, 1973). La enzima posee dos lugares activos, uno para la actividad reductasa y otro para la oxidasa (Oshima y Ochi, 1973; Samuels *et al.*, 1975). La enzima *in situ* está influenciada por los niveles de sustrato, producto y nucleótidos piridínicos.

La testosterona puede seguir dos rutas metabólicas y transformarse en otros esteroides biológicamente activos:

- a.- Ruta de la 5 α -reductasa: transformándose en dihidrotestosterona (DHT).
- b.- Ruta de la aromatasa: transformándose la testosterona en 17 β -estradiol (Bedrak y Samuel, 1969; Oh y Tamaoki, 1970; Houghton *et al.*, 1990), gracias a la acción de la P450_{aro} localizada en el retículo endoplasmático (Robel, 1993a).

Zwain *et al.* (1989) confirmaron la localización de la enzima aromatasa en la fracción microsomal de las células del testículo del caballo, capaz de originar estrógenos. Este complejo sistema enzimático se localiza también a nivel del sistema nervioso central, tejido adiposo (Snow, 1993). La aromatización envuelve dos hidroxilaciones en el C19, seguidos de la pérdida del mismo y la reorganización del anillo A. Gaillard y Silberzahn (1987) y Gaillard (1991) demostraron que la actividad aromatasa aumenta después de los dos años de edad, hasta los ocho años, pudiendo deberse al aumento en el número y volumen de las células de Leydig que ocurre en el caballo de los 2 a los 20 años.

Los andrógenos más importantes producidos por el testículo son C19-esteroides: testosterona, DHT y androstenodiona (AD). Jeffcoate y Short (1970) estudiaron el poder androgénico de la testosterona y la DHT y llegaron a la conclusión de que, si se administraban en la misma cantidad, producían efectos idénticos sobre el crecimiento y la actividad secretora de las glándulas accesorias.

La cantidad de testosterona sintetizada es tan grande, en relación con las otras dos hormonas, que puede considerársele como el andrógeno testicular, representando el 95% de la testosterona, presente en el plasma de hombres normales.

Los estrógenos más importantes, producidos por el testículo, son C18-esteroides: 17 β -estradiol, estrona y estriol, además de dos estrógenos hallados por primera vez en la

yegua: equilina y equilenina (ver figura 3).

ESTEROIDOGENESIS EN LA CORTEZA ADRENAL.

La corteza adrenal es el lugar de síntesis de los glucocorticoides. Cameron y Grant (1967), distinguen en la corteza adrenal equina una zona glomerulosa, una fascicular y otra reticular. La zona fascicular y reticular son, presumiblemente, el lugar de producción de glucocorticoides y andrógenos en el caballo, respectivamente.

El glucocorticoide principal en la circulación del caballo es el cortisol (figura 6), seguido por la cortisona, corticosterona y desoxicorticosterona, en menor proporción (Zolovick *et al.*, 1966).

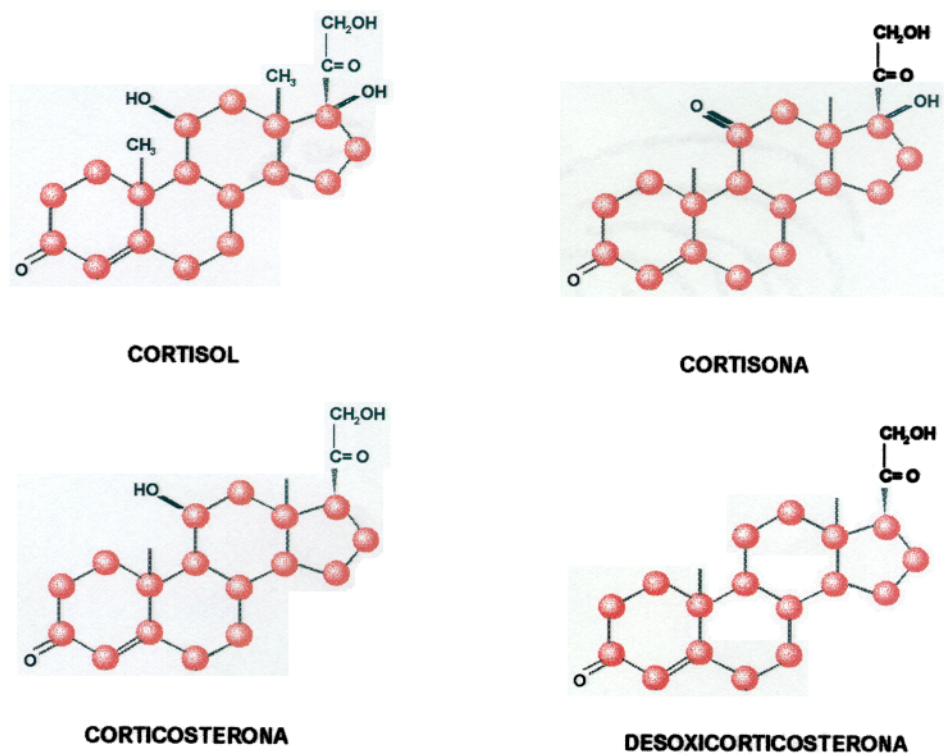


Figura 6.- Principales glucocorticoides

El colesterol, al igual que en las células de Leydig, sirve de precursor para la formación de esteroides adrenales. Aunque la corteza adrenal es capaz de sintetizar colesterol desde acetato, que se introduce en el retículo endoplasmático de la célula adrenal, parece que la mayoría del colesterol usado para la biosíntesis de esteroides adrenales es secuestrado de la circulación. La ACTH estimula la entrada de LDL al interior de la célula adrenal (Hall y Nakamura, 1979).

El movimiento del colesterol del exterior al interior de la membrana mitocondrial de las células adrenales, se estimula por la acción de unas proteínas que además unen la $P450_{sc}$ con el sustrato acelerándose la reducción de la enzima y la escisión de la cadena lateral del colesterol (Yanagibashi *et al.*, 1988). La síntesis de estas proteínas en la célula adrenal se incrementa por la acción de la ACTH. Esta proteína también ha sido obtenida de células de Leydig bovinas, por lo que probablemente la LH actuaría también a este nivel. Otras proteínas y el trifosfato de guanina (GTP) están envueltos en el transporte intramitocondrial de colesterol y en el paso de colesterol a pregnenolona, respectivamente.

El colesterol tiene que sufrir las mismas transformaciones que en el testículo, para transformarse en pregnenolona, en el interior de la mitocondria de la célula adrenal (figura 7). Una vez ocurrido ésto, la pregnenolona se transfiere al retículo endoplasmático para sufrir una serie de transformaciones bioquímicas, a cargo de un equipo enzimático muy desarrollado (James, 1979; James *et al.*, 1985).

La pregnenolona se transforma a 17α -hidroxipregnenolona por acción de la $P450_{c17}$. En la fracción microsomal de la célula adrenal, la $P450_{c17}$ no actúa de la misma forma que en la célula de Leydig. En la zona glomerular de la corteza adrenal, esta enzima no aparece ya que la aldosterona no posee un grupo 17α -hidroxi, mientras que en la zona fascicular y reticular, y para la formación de cortisol, sólo se produce el primer paso, o sea, la 17α -hidroxilación. La hidroxilación de la progesterona a 17α -hidroxiprogesteroona sucede también en el retículo endoplasmático liso, por la acción de la fracción hidroxilasa de esta misma enzima.

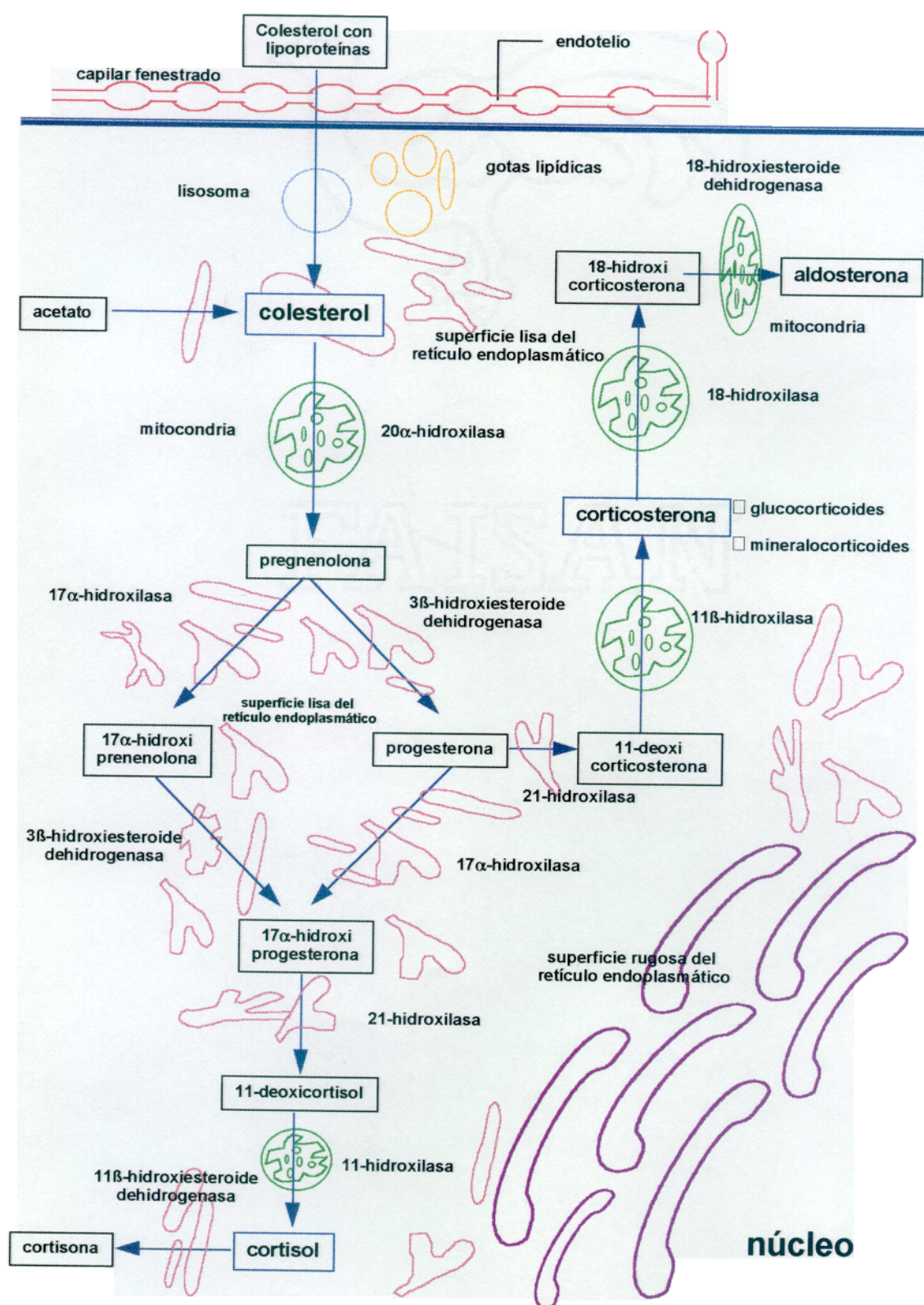


Figura 7

Como la acción 17,20 liasa de la P450_{c17} no es necesaria para la formación de cortisol, tras la formación de la 17 α -hidroxiprogesterona y por actuación de la 21 β -hidroxilasa se obtiene 11-deoxicortisol. La progesterona, por medio de esta misma enzima, se transforma a 11-deoxicorticosterona. Estos productos se introducen nuevamente en la mitocondria y finalmente por 11 β -hidroxilación, se produce corticosterona y cortisol, respectivamente.

La actividad 17,20 liasa de la P450_{c17} es necesaria para catalizar el paso de 17 α -hidroxipregnenolona a deshidroepiandrosterona (DHEA) que representa el andrógeno adrenal secretado en mayor cantidad, y la 17 α -hidroxiprogesterona a androstenodiona. La enzima se encuentra sujeta a inhibición competitiva, de forma que la progesterona y la pregnenolona inhiben esta actividad liasa (Nakajin y Hall, 1981, 1983). También los estrógenos realizan esta inhibición competitiva (Onoda y Hall, 1981).

La mayoría de la DHEA formada es convertida, por una sulfoquinasa adrenal, a sulfato de deshidroepiandrosterona que se transforma posteriormente a androstenodiona que será convertida a testosterona y estradiol.

La glándula adrenal tiene la habilidad de producir estrógenos, andrógenos y progestágenos en suficiente cantidad para tener efectos biológicos, inhibiendo la secreción de gonadotropinas y reduciendo, por tanto, la actividad gonadal y la producción normal de gametos (Nett, 1993c).

Cameron y Grant (1967) observaron la habilidad de las células de la zona fascicular y reticular para la transformación de la pregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesterona a cortisol *in vivo*, encontrando que:

- Ambos tipos de células forman cortisol a partir de esos esteroides.
- La transformación es mayor en la zona fascicular

- La formación de 17α -hidroxiprogesterona, desde pregnenolona, es más lenta que la formación subsecuente de cortisol, desde 17α -hidroxiprogesterona.
- La formación de 17α -hidroxiprogesterona, desde 17α -hidroxipregnenolona, es de 2 a 4 veces más rápida en la zona fascicular que en la reticular.
- La 17α -hidroxilación de la progesterona es, además, más rápida en la zona fascicular que en la reticular.

La ACTH regula la acción enzimática de forma que, el aumento en su concentración, estimula la acción de la 11β , 21 y 17 hidroxilasa y 17 - 20 liasa. Entre los factores que inhiben la actividad de la 11β hidroxilasa se encuentra el cortisol, la androstenodiona y la epinefrina (López-Calderón, 1992).

CRONOBIOLOGIA: RITMOS BIOLOGICOS

Los fenómenos biológicos repetitivos se extienden desde el batir de las alas de un insecto a 2000 ciclos por segundo hasta el ciclo de 10 años que sigue la densidad de población del lince canadiense o a los 120 años del ciclo de floración del bambú. Muchos eventos naturales ocurren de forma precisa, tal es el caso de la salida y la puesta de sol, los ciclos lunares o los cambios estacionales (Sharp *et al.*, 1993). La observación de un proceso fisiológico durante un determinado tiempo, por ejemplo, la concentración de glucocorticoides en plasma o la actividad motora diurna, nos lleva a la conclusión de que períodos de máxima actividad o síntesis alternan con períodos de actividad o síntesis escasa o nula.

En la década de los 50 se inició el estudio de los ritmos biológicos (Halberg y Visscher, 1950) y su relación con el ciclo nictameral o sucesión de luz-oscuridad. El

equilibrio de los parámetros fisiológicos, frente a las perturbaciones del medio externo se denomina homeostasis. Esta fue defendida por los fisiólogos clásicos que se resistían a aceptar la presencia de variaciones en los parámetros biológicos, sincronizados por el ambiente geofísico. Actualmente, las variaciones diarias (ritmos circadianos) están ampliamente aceptadas. Los órganos sensoriales perciben información sobre los cambios producidos en un día natural, y ésta es transportada al cerebro donde actúa un reloj sincronizador que controla los ritmos de los órganos (figura 8).

La cronofisiología estudia las variaciones rítmicas de los procesos fisiológicos en el tiempo, prediciendo no sólo cuándo van a ocurrir, aproximadamente, los valores más altos o más bajos, en un determinado día, sino también, cuándo van a ocurrir en una semana o año. Esta ciencia se basa en la demostración de dos hechos:

a) Se ha demostrado que los ritmos biológicos son endógenos, es decir, están programados en el código genético del organismo, la información pertinente se localiza en el gen *per* (período). Estos hallazgos han sido realizados en las moscas de la fruta (Hamblen-Coyle *et al.*, 1986; Hardin *et al.*, 1990 y Young, 1992), aunque este hecho fue documentado con anterioridad en las mismas especies y en otras muchas, mediante el fenómeno de curso libre (Halberg, 1970a y b).

b) Las variaciones rítmicas están sincronizadas por los diversos ciclos temporales que los cambios geofísicos ofrecen, como pueden ser las horas de luz-oscuridad o el magnetismo terrestre y solar. Los factores externos capaces de sincronizar un ritmo se denominan *Zeitgeber* (dadores de tiempo) o sincronizadores, p.e. el ciclo luz-oscuridad; independientemente del término que utilicemos, el sincronizador sólo puede ser interpretado como un donante del tiempo de reloj o de calendario, no del tiempo interno (Halberg *et al.*, 1954; Nelson *et al.*, 1975; Aschoff y Pohl, 1978). Si mantenemos constante el entorno, el ritmo no desaparece sino que entra en lo que se denomina curso libre; es decir, el ritmo ya no depende del sincronizador, sino que es generado por el propio individuo, demostrando su carácter endógeno. En esta situación, el ritmo se suele desfazar del ciclo del sincronizador, ya que no siempre el ritmo endógeno tiene el mismo período que el

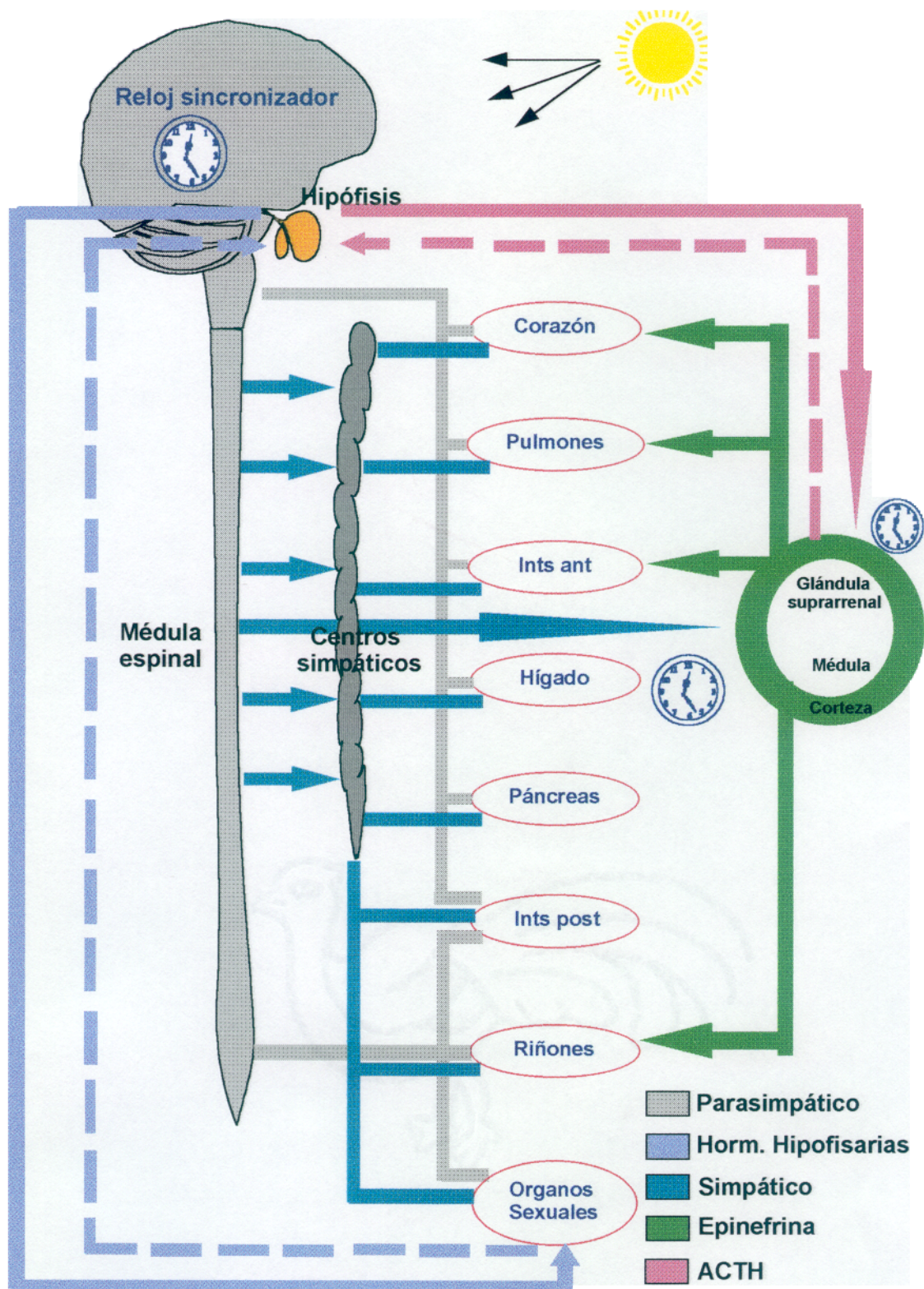


Figura 8

sincronizador. El fenómeno es reversible, de forma que, tan pronto como se restituya el fenómeno que actúa como sincronizador, el ritmo se reajustará al ciclo geofísico. Un ciclo externo, como es el ciclo luz-oscuridad, alternando cada 12 horas, únicamente puede sincronizar un ritmo circadiano. Existe sincronización cuando el período del ciclo externo es cercano al período endógeno natural. En otras palabras, los ritmos circadianos están sincronizados por factores externos como es la luz o la alarma de un reloj, pero no están determinados o producidos por los ciclos ambientales.

Otro aspecto importante de los ritmos circadianos es que una vez sincronizados por cualquier factor ambiental (longitud de día, ingesta o temperatura), se impone la frecuencia del factor ambiental sobre el reloj interno; es decir, el ritmo interno está sincronizado por el tiempo local. Los ritmos hormonales, de conducta, etc., se ajustan a la acción de sincronizadores que a su vez son fenómenos geofísicos repetitivos, como por ejemplo el ciclo de mareas, cambios estacionales, ciclo nictameral, etc.

En otras ocasiones, los ritmos se ven alterados, no sincronizados, por influencias externas; por ejemplo, en otoño se atrasa el reloj y en primavera se adelanta; en estos casos existe cierta dificultad para ajustarse al nuevo horario (1 a 2 semanas) al igual que ocurre cuando se realiza un vuelo transoceánico atravesando distintos husos horarios.

Se entiende por ritmo biológico la recurrencia de un fenómeno (ciclo) a intervalos más o menos regulares. Cronobiológicamente definido, es la componente periódica en una serie temporal biológica, que es predecible y se demuestra mediante cálculos estadísticos, obteniendo de éstos las llamadas características del ritmo. Los fenómenos rítmicos están muy relacionados con la teoría oscilatoria, de hecho, muchos de los términos utilizados en cronobiología han sido tomados de dicha teoría. La terminología cronobiológica puede parecer extraña y complicada al principio, pero con el tiempo, el contacto con los métodos analíticos cronobiológicos y su uso, estos términos se vuelven familiares. Originalmente, los métodos de determinación para el estudio de un período circadiano se realizaban a mano y se tardaba meses o años en la actualidad, los mismos análisis se realizan en segundos o como mucho en minutos, gracias al uso de ordenadores.

Cambios similares de aproximadamente, pero no exactamente, el mismo tipo y extensión, ocurren en aproximadamente, pero no exactamente, los mismos intervalos, en aproximadamente las mismas secuencias, y a todos los niveles de organización de la vida animal o vegetal, desde procariotas a seres humanos (Halberg, 1969). Podemos encontrarnos con valores máximos y mínimos que se repiten periódicamente, es decir, acontecimientos similares que se manifiestan de forma consecutiva y ocurren en intervalos regulares, formando ciclos manifiestos o bioperiodicidades.

Las periodicidades son más generales que la vida, y se encuentran en muchos de los fenómenos investigados por diferentes disciplinas. Por ejemplo, los organismos multicelulares, así como los animales, exhiben comportamientos cíclicos en sus actividades motoras y de alimentación, durante el crecimiento o el desarrollo y la pubertad. De igual forma, las células adrenales de ratón sintetizan corticosterona *in vivo*, no de una forma arbitraria, sino que cada célula lo hace con una periodicidad similar (Halberg, 1963), al igual que las células pineales perfundidas sintetizan melatonina (Ungar y Halberg, 1963; Leung *et al.*, 1990).

Para estudiar cómo evoluciona un fenómeno rítmico a lo largo del tiempo se hacen mediciones, preferentemente a intervalos fijos. El muestreo se denomina *longitudinal*, si las determinaciones se hacen en un mismo sujeto ($n=1$) durante varios ciclos. El muestreo se denomina *transversal*, si se realiza en varios sujetos ($n>1$) a lo largo de un sólo ciclo. En la actualidad los estudios se suelen realizar de forma mixta; es decir, combinando la toma de muestra longitudinal y transversal.

El muestreo debe realizarse a intervalos lo suficientemente cortos para resolver algunos ritmos con relativas altas frecuencias, y durante un tiempo lo suficientemente largo, para obtener algunos de los componentes de baja frecuencia. Se deberían tomar más de 6 muestras por período, para poder ajustar una función sinusoidal a la variable considerada y obtener un margen de confianza suficiente. También se debe tener en cuenta que un mismo proceso fisiológico puede estar sujeto a más de un ritmo.

El término **circadiano** (del latín *circa*, alrededor de, y *diem*, día) significa que el período del ritmo endógeno se aproxima, pero no suele ser igual, a las 24 horas. Frecuencias mayores o menores que éstas son denominadas **ultradianas** (período $[\tau]$ menor de 20 horas) e **infradianas** ($\tau > 28$ horas), respectivamente. Ritmos de, aproximadamente, 7 días se denominan **circaseptanos**, de, aproximadamente, 30 días **circatrigintanos** y de, aproximadamente, 1 año **circanuales**. Estos tres últimos se encuentran dentro de la clasificación infradiana. A continuación vamos a citar algunos de estos ritmos biológicos, con sus ejemplos respectivos.

REGION DEL DOMINIO	MARGEN	EJEMPLO
Ultradiano	$\tau < 20 \text{ h}$	
circaoctohorano	$\tau = 8 \pm 1 \text{ h}$	Presión sanguínea (PS)
circasemidiano	$\tau = 12 \pm 2 \text{ h}$	Frecuencia cardíaca (FC)
Circadiano	$\tau = 24 \pm 4 \text{ h}$	PS, FC, Temperatura
Infradiano	$\tau > 28 \text{ h}$	
circasemiseptano	$\tau = 3,5 \pm 1 \text{ d}$	Muerte repentina en humana
circaseptano	$\tau = 7 \pm 1 \text{ d}$	Rechazo de transplantes
circadiseptano	$\tau = 14 \pm 3 \text{ d}$	Excreción 17-oxoesteroides
circatrigintano	$\tau = 30 \pm 5 \text{ d}$	PS
circanual	$\tau = 1 \pm 2 \text{ m}$	Prolactina y cortisol

Para considerar un fenómeno *diurno* significa que sucede durante el día y no implica una base circadiana, aunque un ritmo diurno podría ser circadiano. El término *nictameral* relaciona ritmos que ocurren durante el día y la noche; por ejemplo, la secreción de melatonina.

Se ha demostrado que la secreción de hormonas suprarrenales en el hombre, presenta un ritmo circadiano relacionado con los períodos de sueño-vigilia, con un máximo de secreción por la mañana temprano y un mínimo justo antes de dormir. Halberg

(1959,1969) presentó y documentó el ciclo circadiano adrenocortical como una entidad endógena que presenta curso libre, al producir una enucleación bilateral del nervio óptico en los ratones, pero sincronizado por un ciclo que alterna la luz con la oscuridad (Halberg *et al.*, 1954, 1959). Portela *et al.* (1993) e Illera *et al.* (1993c), demostraron la existencia de variaciones circadianas del cortisol en conejos sometidos a distintos ciclos de luz-oscuridad.

Al igual que en otras especies, se han determinado variaciones circadianas de cortisol en el caballo (Hoffsis *et al.*, 1970; James *et al.*, 1970; Bottoms *et al.*, 1972; Seren y Venturini., 1972; Flisinska-Bojanowska *et al.*, 1974; Evans *et al.*, 1977; Kirkpatrick *et al.*, 1977; Larsson *et al.*, 1979; Glardon y Schatzmann, 1982; Stull y Rodiek, 1988; Toutain *et al.*, 1988; Flisinska-Bojanowska *et al.*, 1991).

Además del ritmo circadiano existe una secreción episódica, es decir, la secreción de cortisol no es continua, sino intermitente durante periodos de tiempo de apenas unos minutos. En estos periodos la corteza puede no secretar cortisol durante minutos e incluso durante horas (López-Calderón, 1992; Weitzman *et al.*, 1971). Asimismo, se ha observado este tipo de secreción en el perro (Kemppainen *et al.*, 1984), en el toro (Thun *et al.*, 1981), en la oveja (Fulkerson y Tang, 1979) y en el caballo (Toutain *et al.*, 1988; Nett, 1993b).

Se ha demostrado la existencia de variaciones circadianas de testosterona en conejos (Silván *et al.*, 1990), en corderos (Garnier *et al.*, 1977), en hamsters (Ottenweller *et al.*, 1987), en el toro (Sanwall *et al.*, 1974), en el hombre (Alford *et al.*, 1973; Reinberg *et al.*, 1978), en el semental (Sharma, 1976; Kirkpatrick *et al.*, 1976; Bono *et al.*, 1982; Byers *et al.*, 1983) y en ponies (Kumar *et al.*, 1976), así como secreciones de tipo episódico en toros (Thibier, 1976; Lincon, 1976) y en el hombre (Alford *et al.*, 1973) y secreciones de tipo pulsátil en ratas (Bartke *et al.*, 1973).

Estas hormonas también varían estacionalmente en el caballo, con niveles máximos en primavera y verano y niveles mínimos en el invierno (Nett, 1993c). Se ha demostrado la existencia de variaciones en las concentraciones de hormonas gonadales y adrenales en

otras especies (Wong *et al.*, 1983).

Los ciclos reproductores de numerosas especies son ciclos circanuales, ligados al mejor momento para la procreación y el nacimiento. Ciertas características hormonales y seminales, así como muchos aspectos del comportamiento sexual, están afectados por las estaciones; por ejemplo, las células de Sertoli proliferan en el caballo, cuando se acerca la estación sexual (Johnson y Nguyen, 1986; Johnson y Tatum, 1989). Según Berndtson *et al.* (1983) y Johnson y Neaves (1981), la puesta en marcha de la época reproductora está asociada con un aumento en el diámetro de los túbulos seminíferos, junto con el incremento en la concentración de testosterona y en la tasa de espermatogénesis. Durante los meses de noviembre a enero, los testículos son un 25% más ligeros, contienen 35% menos células de Leydig y menos retículo endoplasmático liso. Contienen un 35% menos de células de Sertoli y producen de 40 a 50% menos espermatozoides. El volumen de secreción de las células de Leydig, por testículo, pasa de 12 ml en invierno a 20 ml en verano. Este aumento de volumen procede del incremento en número de las células de Leydig, por testículo (de $1,8 \times 10^9$ en invierno a $2,9 \times 10^9$ en verano) más que de la variación estacional en el tamaño celular (Johnson y Thompson, 1986; Johnson y Thompson, 1987). El aumento en el número de células de Leydig, y por tanto, el aumento del volumen de secreción, se traducen en un cambio en la cantidad de retículo endoplasmático liso por testículo, lo que parece ser el determinante primario de la capacidad esteroidogénica (Zirkin *et al.*, 1980).

La influencia de la estación sobre las características reproductivas del semental se caracteriza por un aumento del tamaño y el peso de los testículos (Berndtson *et al.*, 1983; Johnson y Thompson, 1983; Clay *et al.*, 1987; Pickett *et al.*, 1989), por las características del eyaculado (Pickett *et al.*, 1975; Clay *et al.*, 1987), el establecimiento de la espermatogénesis (Johnson *et al.*, 1991), el establecimiento de la pubertad (Squires, 1993) y el cambio en las concentraciones de testosterona, LH, FSH y estradiol (Raeside, 1978/1979; Berndtson *et al.*, 1974; Thompson *et al.*, 1977, 1978; Harris *et al.*, 1983; Roser y Hughes, 1992a,b). Durante los meses de noviembre a enero la concentración de hormonas envueltas en la función reproductora es menor (Amann, 1993a; Douglas y Umphenour, 1992).

Múltiples estudios, realizados a lo largo de un año, demuestran la influencia del fotoperíodo sobre la producción gonadal de testosterona en sementales (Berndtson *et al.*, 1974; Harris *et al.*, 1983; Thompson *et al.*, 1985; Cox *et al.*, 1988; Clay *et al.*, 1988; Floris *et al.*, 1989) y en la respuesta testicular e hipofisaria a la administración de GnRH (Clay *et al.*, 1989; Blue *et al.*, 1991).

Según Pickett (1993), al aumentar la longitud de los días, en los meses de febrero a abril, se puede maximizar la eficiencia reproductora del semental. La exposición a 16 horas de luz y 8 de oscuridad comenzando a mediados o a finales de diciembre en latitudes norte, y el mantenimiento bajo estas condiciones hasta principios de junio, con 16 horas de luz natural, produce una estimulación máxima de la capacidad reproductora. Para que este proceso sea efectivo el semental debe ser expuesto a las horas de luz decrecientes del otoño, porque, como la mayoría de los reproductores estacionales, el caballo requiere períodos alternantes en la longitud de los días para una apropiada sincronización del ciclo anual.

La actividad gonadal resurge estacionalmente en el caballo al ser estimulado por la mayor longitud de los días de primavera (Argo *et al.*, 1991). Los sementales poseen un ritmo circanual endógeno en la función reproductora, que no está determinado por la relación luz/oscuridad, sino que está sincronizado por los cambios anuales en la longitud de los días (Clay y Clay, 1992; Pickett, 1995). La disminución en la longitud de los días en el otoño actúa como sincronizador del ritmo reproductivo circanual del semental (Clay *et al.*, 1988). Cox *et al.*, (1988) demostraron que al cambiar bruscamente de días largos a cortos se producía una inhibición de la esteroidogénesis, y que al exponer los sementales, de forma continuada, a días largos eran incapaces de mantener elevada su actividad reproductiva y se volvían refractarios a la fotoestimulación.

Como hemos podido observar a lo largo de esta introducción hemos tratado temas, aparentemente, tan independientes como la esteroidogénesis a nivel testicular y en la glándula adrenal, y la influencia del fotoperíodo o los cambios de la luz. En el último apartado de la introducción, la cronofisiología relaciona cada uno de estos temas, aludiendo la sincronización de la ritmicidad hormonal con el medio ambiente.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Para la realización de este estudio se han utilizado un total de 8 animales pertenecientes a la cuadra Valdeolivas situada en el término municipal de Arenas de San Pedro (Avila), de Pura Raza Española, sexualmente maduros, con edades comprendidas entre los 3 y los 13 años (Naden *et al.*, 1990).

Los sementales fueron alojados en boxes cubiertos, provistos de iluminación natural con unas duraciones aproximadas de los periodos de luz-oscuridad (LO) de:

- LO 16:08 en los días largos,
- LO 09:15 en los días cortos.

En las cuales el primer número se refiere al período de luz (fotofracción) y el segundo a la duración de la oscuridad (escotofracción), en un régimen de luz cíclico de 24 horas.

La alimentación y disponibilidad de agua fue *ad libitum* y el estado sanitario fue controlado semanalmente: temperatura, número de pulsaciones/minuto, número de respiraciones/minuto, estado de las mucosas y tiempo de llenado capilar.

TOMA DE MUESTRAS

1º Material

Fueron utilizados tubos Vacutainer (Becton Dickinson) heparinizados de 16 x 100 mm y agujas especiales para dichos tubos de 21 G (0,9 x 25 mm), así como portagujas especiales para estos tubos.

2° Metodología empleada en la toma de muestras

En nuestro estudio hemos desarrollado la siguiente metodología para llevar a cabo la determinación de los patrones circasemidiano, circadiano, circaseptano y circanual.

En la obtención de las muestras para la determinación del patrón circasemidiano y circadiano de las hormonas testosterona, 17β -estradiol y cortisol, se empleó un estudio transversal con recogida de muestras serialmente dependiente. En este procedimiento, cada semental proporciona 10 muestras de sangre, durante un ciclo de 27 horas. Se recogieron 10 ml de sangre, por punción de la vena yugular, cada tres horas (8:00 a.m., 11:00 a.m., 14:00 p.m., 17:00 p.m., 20:00 p.m., 23:00 p.m., 2:00 a.m., 5:00 a.m., 8:00 a.m. y 11:00 a.m.) tanto en días largos (junio) como en días cortos (noviembre). Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su posterior centrifugado.

Para la determinación del patrón circaseptano, las muestras fueron recogidas diariamente, durante siete días, a la misma hora (11:00 a.m.), obteniendo 7 muestras de cada animal.

El patrón circanual se determinó tomando una muestra semanal (todos los martes), a la misma hora durante 12 meses, obteniendo 52 muestras de cada semental.

Para la obtención del plasma, se utilizó una centrífuga Minifuge RF (Heraeus) a $1.300 \times g$ y a 4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se recogió mediante micropipetas Eppendorf y se almacenó en tubos de plástico de 15 x 50 mm con tapón, sellados con parafilm (American Can Company) previamente etiquetados con el nombre del animal, número de la alicuota, hora de recogida y fecha de la misma.

El plasma se almacenó a -30°C hasta la realización del análisis hormonal.

DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES HORMONALES

1º Validación del Enzimoinmunoanálisis ELISA de competición:

Se realizó la validación del método enzimunoanalítico, ELISA de competición, previamente desarrollado para las distintas hormonas esteroides que se van a analizar (Silván, 1991), con el fin de adaptar este método a la especie animal y a la raza objeto de estudio:

- A) Material y reactivos empleados
- B) Fijación de las condiciones del ensayo: fase sólida, tiempos de incubación, temperatura de realización de las distintas etapas del ensayo, tiempos de lavado y tapizado de las microplacas.
- C) Establecimiento de las diluciones óptimas de trabajo de anticuerpo y conjugado.
- D) Construcción de las curvas patrón.
- E) Desarrollo de la técnica ELISA de competición.
- F) Parámetros de validación.

A) Material y reactivos utilizados:

Material:

- Microplacas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano y con una capacidad de 350 µl por pocillo (Dynatech).

- Tapas de poliestireno para placas de ELISA (Dynatech).
- Puntas desechables, para pipetas Eppendorf, de 10-200 μl y de 100-1000 μl (Comfortips, Eppendorf).
- Puntas de pipeta multicanal, 25-250 μl (Costar).
- Pipetas automáticas Eppendorf (Merck) de 10-100 μl y de 100-1000 μl .
- Pipeta multicanal de ocho canales, de 50-250 μl (Costar).
- Agitador (Vórtex) Reax 2.000 (Heindolph).
- Pipetas de cristal de doble enrase de 5 y 10 ml (Protón).
- Parafilm (American Can Co).
- Tubos de ensayo de cristal de 16 x 100 mm (Becton Dickinson).
- Lector automático de placas (Eurogenetics).

Reactivos:

- Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) (Merck).
- Ácido 2-[(etilmercurio)benzoico], sal sódica (Thimerosal) (Merck).
- Agua purificada.
- Albúmina sérica bovina, fracción V (Cohn, Sigma & Co).

- Anticuerpos policlonales obtenidos y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria, U.C.M.): antitestosterona, anti17 β -estradiol y anticortisol.
- Conjugados hormona-peroxidasa, preparados y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal (Facultad de Veterinaria, U.C.M.).
- Etanol absoluto (Prolabo).
- Hormonas esteroideas estándar (Steraloids In., N.Y. USA):
 - * 4-Androsten-17 β -ol-3-ona: testosterona.
 - * 1,3,5 (10)-Estratriene-3,17 β -diol: 17 β -estradiol.
 - * 4-Pregnen-11 β , 17 α , 21triol-3,20 dione: cortisol.
- Ortofenilén-diamina dihidroclorhidrato (OPD) (Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA).
- HRP RZ = 3,2 (peroxidasa de rábano picante) (Boehringer Mannheim).
- Di-sodiohidrogenofosfato anhidro (Na₂HPO₄) (Merck).
- Peróxido de hidrógeno: H₂O₂ 30% y 110 vol. (Merck).
- Carbonato sódico (Na₂CO₃) (Merck).
- Citrato di-básico sódico 1^{1/2} Hidrato (NaH₂C₆H₅O₅ · 1^{1/2}) (Panreac).
- Cloruro sódico (NaCl) (Probus).
- Dihidrogenofosfato sódico monohidrato (NaH₂PO₄ · H₂O) (Merck).

- Hidrogenocarbonato sódico (NaHCO_3) (Merck).
- Tween-20 (Merck).

Soluciones tampón

- Carbonato-bicarbonato: 0,05 M: pH: 9,6.

Para 1000 ml de solución:

- * Na_2CO_3 : 1,59 g.
- * NaHCO_3 : 2,93 g.
- * Thimerosal 1%: 5 ml.

Conservar a 4°C.

- Solución tampón ELISA: pH: 7,0.

Para 1.000 ml de solución:

- * $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 5,421 g.
- * Na_2HPO_4 : 8,662 g.
- * NaCl: 8,7 g.
- * Albúmina sérica bovina: 1,0 g.
- * Thimerosal 1%: 5 ml.

Conservar a 4°C.

- Solución tampón sustrato: pH: 4,8.

Para 1.000 ml de solución:

- * $C_6H_8O_7$: 13 g.
- * $NaH_2C_6H_5O_5 \cdot 1^{1/2}$: 28 g.
- * H_2O_2 30% 110 vol: 1ml.
- * Thimerosal 1%: 10 ml.

Conservar a 4°C.

- Solución de lavado: Solución madre (10x).

Para 1.000 ml de solución:

- * NaCl 1,5 M: 87,66 g.
- * Tween-20 0,5%: 5 ml

Conservar a temperatura ambiente.

B) Fijación de las condiciones del ensayo:

Según el criterio de Silván (1991):

- Fase sólida:

Se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos y fondo plano con tapa de poliestireno y parafilm.

- Condiciones de incubación:

- Inmovilización del anticuerpo a la fase sólida: 16 horas a 4°C.
- Reacción de competición: 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente.
- Hidrólisis del sustrato: 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente.

La temperatura ambiente no debe superar los 24°C ya que las reacciones enzimáticas no serían estables pudiendo aparecer variaciones en las medidas de absorbancia.

- Tiempos de lavado y tapizado:

- Tiempo de lavado: 5-10 segundos cada uno.
- Tiempo de tapizado con la solución de conjugado: no superior a 10 minutos.

C) Establecimiento de las diluciones óptimas de trabajo de anticuerpo y conjugado:

Para determinar la dilución óptima de anticuerpo y conjugado para las dos hormonas debemos enfrentar diluciones diferentes de anticuerpo y conjugado.

Las diluciones de anticuerpo empleadas son 1/2.000, 1/4.000 y 1/6.000 y para el conjugado 1/20.000, 1/50.000 y 1/60.000.

Las diluciones se distribuyen en la microplaca de la siguiente forma:

- Anticuerpo:

* Columna 1-4: 1/2.000

* Columna 5-8: 1/4.000

* Columna 9-12: 1/6.000

- Conjugado:

* Filas A-B: 1/20.000

* Filas C-E: 1/50.000

* Filas F-H: 1/60.000

A continuación se seleccionan las diluciones que presenten una densidad óptica de 0,6 a 0,8 a 450 nm (Munro y Stabenfeldt, 1984):

- Testosterona: 1/6.000 de anticuerpo y 1/50.000 de conjugado.
- 17 β -estradiol: 1/2.000 de anticuerpo y 1/20.000 de conjugado.
- Cortisol: 1/6.000 de anticuerpo y 1/60.000 de conjugado.

D) Construcción de las curvas patrón:

Para trazar la curva patrón o estándar de cada una de las hormonas se parte de una solución madre, de testosterona, 17 β -estradiol o de cortisol, de concentración conocida: 2 mg/ml en etanol absoluto la cual se va diluyendo sucesivamente hasta obtener una serie de diluciones estándar cuyo margen varíe desde 1 pg hasta 1 ng por pocillo.

Las soluciones estándar se preparan en tubos de cristal de 10 x 50 mm en etanol absoluto, dejando que el alcohol se evapore. A continuación añadimos el conjugado, a la dilución de trabajo, en los distintos tubos con las concentraciones estándar.

El margen de la curva patrón se calcula en función de la concentración esperada de la hormona a determinar, en el plasma de la especie animal utilizada.

E) Desarrollo de la técnica ELISA de competición:

La técnica ELISA de competición se basa en la reacción entre un anticuerpo específico fijado a una fase sólida con una muestra problema que compete, con el conjugado hormona-enzima, por los sitios de unión del anticuerpo. A continuación se mide la fracción de hormona marcada unida al anticuerpo mediante la adición del sustrato y se lee la absorbancia del color desarrollado.

Comprende las siguientes etapas:

- 1) Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida.
- 2) Reacción de competición: adición de la muestra y del conjugado.
- 3) Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos en la fase sólida.
- 4) Adición del sustrato y del cromógeno.
- 5) Lectura y procesado de los resultados.

1) Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida:

Se diluye el anticuerpo convenientemente en solución tampón carbonato/bicarbonato, hasta llegar a la dilución de trabajo correspondiente a cada hormona. A continuación se tapizan los pocillos con 100 μ l, excepto el pocillo A1 que se deja como blanco.

Se sellan las placas con parafilm, se tapan y se incuban a 4°C durante 16 horas.

Seguidamente se lava la placa cinco veces con solución de lavado (200 µl por pocillo) para eliminar el exceso de anticuerpo que no se ha fijado a la placa y se seca enérgicamente mediante volteo en papel de filtro.

2) Reacción de competición

La reacción se produce entre la hormona sin marcar, ya sea de la muestra o estándar, y la hormona conjugada a la enzima u hormona marcada..

Se diluyen los conjugados en solución tampón EIA y se mezclan tanto la muestra problema como la estándar con la dilución de trabajo de conjugado.

Se añade a todos los pocillos 50 µl de tampón ELISA mediante una pipeta multicanal.

Las muestras estándar y problema se determinan por duplicado distribuyéndose 50 µl por pocillo de la siguiente manera (ver figura):

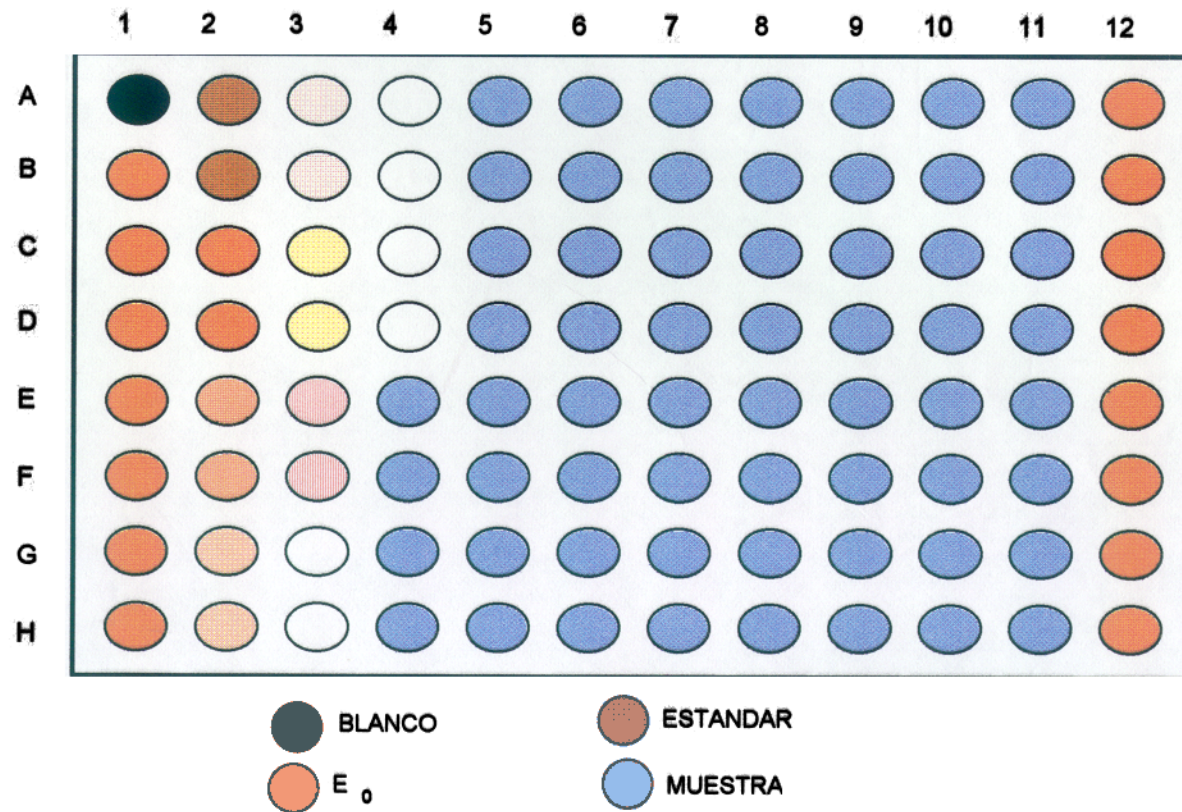
Columna 1: Se añade solamente dilución de conjugado. Es la denominada E₀S.

Columnas 2-3: Se añaden las muestras estándar mezcladas con el conjugado.

Columnas 5-11: Se añaden las muestras problemas mezcladas con el conjugado.

Columna 12: Se añade solamente dilución de conjugado. (E₀E)

DISTRIBUCION DE LA PLACA PARA EIA DE COMPETICION



Las placas se sellan con parafilm y con su correspondiente tapa, incubándose durante un período de dos horas en la oscuridad a temperatura ambiente.

3) Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos adsorbidos en la fase sólida:

Se realiza por volcado de las placas y posterior lavado con 200 μ l por pocillo (cinco veces). A continuación, los pocillos de la placa se secan perfectamente.

4) Adición del sustrato y del cromógeno:

El sustrato se prepara diluyendo 10 μ l de peróxido de hidrógeno (30%, 110 vol.) en 10 ml de tampón sustrato. Treinta minutos antes de ser utilizado se le añade el cromógeno ortofenilendiamina dihidroclorhidrato (OPD), a una concentración de 1 mg/ml. Esta solución debe ser guardada herméticamente en la oscuridad a temperatura ambiente.

En todos los pocillos de la placa se añaden 100 μ l de la mezcla, se sella con parafilm, se tapa y se incuba una hora en oscuridad a temperatura ambiente.

5) Lectura de las placas:

Una vez transcurrido el tiempo de reacción del sustrato, se procede a la lectura de la densidad óptica del color desarrollado, para ello se emplea un lector automático de ELISA (Eurogenetics) el cual mediante filtros de 450 y 600 nm, realiza una lectura bicromática eliminando el color producido por una posible reacción de fondo.

F) Parámetros de validación:

Los parámetros de validación que se determinan son: especificidad, precisión y repetibilidad, exactitud y sensibilidad.

1º Especificidad

Se determina mediante el estudio de las reacciones cruzadas de los anticuerpos policlonales específicos de cada hormona con distintos esteroides.

2º Precisión y repetibilidad

Consiste en determinar el coeficiente de variación intra e inter-análisis. Para el cálculo del coeficiente de variación intra-análisis, se realizan diez determinaciones, por duplicado y dentro de una misma placa, de distintas concentraciones conocidas de la hormona (5 pg/pocillo, 50 pg/pocillo y 500 pg/pocillo) junto con 20 muestras problema (también por duplicado). Para el cálculo del coeficiente de variación inter-análisis, se repite el mismo análisis durante diez días consecutivos.

3º Exactitud

Se determina calculando el porcentaje de recuperación de concentraciones conocidas de hormona (1,0; 5,0; 10,0 y 15,0 ng/ml muestra) que se añaden a muestras problemas elegidas al azar.

4º Sensibilidad

Puede ser determinada de dos formas:

- Calculando el límite de detección que corresponde a los valores medios de E_0 menos dos desviaciones estándar (D.S.) de ocho ensayos consecutivos. (Abraham, 1975).
- Calculando la concentración de hormona que causa el 50 % de reducción del valor de unión inicial. (Van Weemen y Schuurs, 1975).

2° Análisis hormonal de las muestras

Una vez validada la técnica ELISA de competición para la determinación de testosterona, 17β -estradiol y cortisol, en el plasma equino, se analizan las muestras de plasma de los distintos animales.

La determinación de testosterona, 17β -estradiol y cortisol se realiza directamente en plasma sin extraer.

El primer paso consiste en tapizar con una dilución apropiada del anticuerpo correspondiente los 95 pocillos (100 μ l/pocillo) de la microplaca (el pocillo A1 actuará como blanco) y su posterior sellado con parafilm, tapado e incubación en nevera a 4°C durante 16 horas.

Pasado el tiempo de incubación se realizan cincolavados con solución de lavado (200 μ l/pocillo) para eliminar el exceso de anticuerpo que no se adsorbe a la placa.

Las muestras se deben preparar para el análisis. Una vez descongeladas se colocan en una gradilla y se introducen en una estufa a 60°C, durante 30 minutos, para su desnaturalización, dado que el esteroide no sufre ningún daño a la temperatura a la que se produce la desnaturalización protéica (Silván, 1991).

A continuación se procede a diluir las muestras en una solución de conjugado en igual proporción: 100 μ l de muestra se diluyen en 100 μ l de conjugado en un tubo de ensayo de cristal de 25 x 70 mm y son cuidadosamente homogeneizadas mediante un vórtex. Utilizamos 50 μ l de esta solución junto con 50 μ l de tampón EIA para tapizar los pocillos de la placa de poliestireno.

Las placas se sellan de nuevo y se incuban durante dos horas a temperatura ambiente en oscuridad.

El último paso consiste en la adición de un sustrato (peróxido de hidrógeno) y el cromógeno (OPD) previo lavado de la placa. La mezcla es preparada media hora antes de ser utilizada, se cierra herméticamente, para prevenir la auto-oxidación y se guarda en oscuridad a temperatura ambiente.

En todos los pocillos de la placa se añaden 100 µl de la mezcla sustrato-cromógeno. Tras sellar la placa con parafilm, se tapa y se deja reaccionar a temperatura ambiente y en la oscuridad durante una hora.

A continuación se realiza la lectura en un lector automático ELISA de lectura bicromática lo que elimina el color producido por una posible reacción de fondo inespecífica. Los filtros utilizados son de 450 nm y 600 nm.

El tiempo que transcurre desde la dilución de las muestras hasta el tapizado del último pocillo no debe sobrepasar los 10 minutos debido a que las variaciones de absorbancia observadas en la determinación de una misma muestra pueden alterar la repetibilidad de la técnica de análisis.

3ª Procesado de los resultados

El procesado de los resultados obtenidos en el análisis hormonal se realiza con la ayuda de un programa informático diseñado especialmente para ello en el Departamento de Informática de la Universidad de California (Davis, USA).

Este programa calcula la curva patrón al enfrentar las concentraciones estándar de cada una de las hormonas con sus respectivas diluciones (eje de abcisas) y el porcentaje de unión de las muestras estándar con el anticuerpo (E/E_0) (eje de ordenadas).

A continuación el programa calcula las concentraciones de las muestras problemas tomando como referencia las curvas patrón. Para expresar estas concentraciones en las unidades correctas es necesario la introducción de un factor de corrección en función de la

dilución que hayamos utilizado. Las concentraciones de cortisol y testosterona se expresan en ng/ml y las de 17 β -estradiol en pg/ml

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio del software BMDP (Biomedical Data Program) (Dixon, 1992), en el centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid.

Se realizó el análisis de varianza y covarianza con medidas repetidas y el test de comparación múltiple de Bonferroni (BMDP2V), junto con el test no paramétrico de Friedman (BMDP3S) para estudiar la distribución de las variables estadísticas y test de diferencias de medias (BMDP3D), para comprobar si las distintas variables poseen diferencias estadísticamente significativas.

Las variables estadísticas analizadas son:

- Número de animales.
- Concentraciones plasmáticas de testosterona (T), 17 β -estradiol (E₂) y cortisol (C).
- Hora y/o día de la toma de muestra.

RESULTADOS

1. Diluciones óptimas de anticuerpo

Los resultados obtenidos tras las pruebas realizadas para calcular la dilución de trabajo óptima, a emplear, de anticuerpo para EIA de competición fueron:

* Anti-testosterona: 1/6.000.

* Anti-17 β -estradiol: 1/2.000.

* Anti-cortisol: 1/6.000.

2. Diluciones óptimas de conjugado

Este factor es crítico para una puesta a punto óptima del método. Los resultados fueron los siguientes:

* Conjugado HRP-testosterona: 1/50.000.

* Conjugado HRP-17 β -estradiol: 1/20.000.

* Conjugado HRP-cortisol: 1/60.000.

3. Validación del EIA de competición para las hormonas esteroideas (testosterona, 17 β -estradiol y cortisol).

- Precisión y repetibilidad:

Cálculo de los coeficientes de variación intra e inter-ensayo.

$$\% CV = \text{Desviación estándar}/\text{media} \times 100$$

En nuestro caso, los % CV intra e inter-análisis fueron siempre menores del 7% para todas las hormonas estudiadas.

- Exactitud

Los porcentajes de recuperación en todos los casos oscilan entre 85-95% ($p < 0,05$).

- Sensibilidad

Se determinó de dos formas:

- Límites de detección:

Testosterona: 6 pg/pocillo.

17 β -estradiol: 0,3 pg/pocillo.

Cortisol: 3 pg/pocillo.

Sensibilidad al 50 % de unión:

Testosterona: 83 pg/pocillo

17 β -estradiol: 8,3 pg/pocillo

Cortisol: 58,82 pg/pocillo.

4. Concentraciones plasmáticas de las hormonas testosterona, 17 β -estradiol y cortisol a lo largo del año.

En la Gráfica 1 queda reflejado el patrón circanual para la hormona testosterona. La concentración máxima aparece en el mes de julio, más concretamente, en la cuarta semana, con un valor de $4,57 \pm 0,73$ ng/ml; mientras que, la concentración mínima la obtuvimos en el mes de febrero con una media de $1,01 \pm 0,1$ ng/ml. El nadir corresponde a la tercera semana de febrero, con una concentración de $0,85 \pm 0,05$ ng/ml.

La Tabla 1 ilustra las concentraciones (media \pm ES), con las que se ha construido la gráfica citada.

El análisis de varianza con medidas repetidas revela, según el test de comparaciones múltiple de Bonferroni, que existe una variación significativa de la concentración de testosterona ($p < 0,05$) a lo largo del año. El test no paramétrico de Friedman demuestra esta misma variación.

La Gráfica 2 ilustra el patrón circanual de la secreción de 17 β -estradiol. Las máximas concentraciones se obtuvieron la primera semana del mes de julio con $116,58 \pm 21,94$ pg /ml. Seguidamente comienza el descenso brusco hasta llegar a la quinta semana del mes de marzo, donde apareció un nadir de $16,22 \pm 1,66$ pg/ml.

El análisis estadístico (test de Bonferroni y de Friedman) mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En la Tabla 2 aparecen las concentraciones de 17 β -estradiol (media \pm ES) a lo largo del año.

En la Gráfica 3 está recogido el patrón circanual de cortisol, donde aparece la concentración mínima correspondiente a la tercera semana del mes de marzo, con valores de $56,07 \pm 9,37$ ng/ml y la concentración máxima correspondiente a la segunda semana del

mes febrero, con valores de $319,18 \pm 53,10$ ng/ml.

En la Tabla 3 están detalladas las concentraciones de cortisol (media \pm ES) sobre las que se ha construido la gráfica.

El análisis de la varianza con medidas repetidas fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en los dos test empleados (test de Bonferroni y test de Friedman).

5. Concentraciones plasmáticas de testosterona, 17 β -estradiol y cortisol a lo largo de la semana.

En la Gráfica 4 está representado el patrón circaseptano para la hormona testosterona, con unos niveles máximos a comienzos de semana $1,58 \pm 0,23$ ng/ml y unos niveles mínimos a mediados de la misma con $0,92$ ng/ml $\pm 0,07$ ng/ml.

La Tabla 4 revela las concentraciones (media \pm ES) semanales de testosterona.

El análisis estadístico nos muestra que existe una variación significativa de la concentración de testosterona a lo largo de la semana ($p < 0,05$), tanto en el test de Bonferroni, como en el test de Friedman.

En la Gráfica 5 está reflejado un patrón circaseptano en la secreción del 17 β -estradiol, con niveles máximos el sábado, con concentraciones de $43,64 \pm 7,40$ pg/ml y valores mínimos los jueves, con una concentración de $29,00 \pm 3,43$ pg/ml, existiendo diferencias, estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre los días de la semana.

En la Tabla 4 se encuentran representados los valores medios (media \pm ES) de las concentraciones de esta hormona, a lo largo de la semana.

En la Gráfica 6 se exponen las concentraciones de cortisol obtenidas a lo largo de la semana. La concentración máxima se obtuvo el martes ($112,10 \pm 14,80$ ng/ml)

manteniéndose en altos niveles hasta finales de semana.

En la Tabla 4 aparecen todas las concentraciones sobre las que se ha construido la gráfica citada. El análisis estadístico fue significativo ($p < 0,05$) para los dos test empleados (test de Bonferroni y test de Friedman).

6. Concentraciones plasmáticas de testosterona, 17β -estradiol y cortisol a lo largo de días cortos y largos.

La Gráfica 7 refleja la existencia de un patrón circadiano de la testosterona en los días cortos, con un pico máximo de testosterona de $2,10 \pm 0,36$ ng/ml a las dos de la tarde y un segundo pico a las once de la noche con una concentración de $1,47 \pm 0,11$. El primer nadir lo encontramos a las ocho de la tarde con un valor de $0,97 \pm 0,10$ ng/ml. El segundo mínimo de $0,88 \pm 0,10$ ng/ml se produce a las 8 de la mañana del día siguiente.

En la Tabla 5 aparecen los valores (media \pm ES) sobre los que ha sido construida la gráfica.

El análisis de varianza muestra diferencias, estadísticamente significativas ($p < 0,05$), en la concentración de testosterona a lo largo de los días cortos.

El patrón circadiano de días cortos para la hormona 17β -estradiol aparece en la Gráfica 8. El primer nadir aparece a las once de la mañana, con un valor de $31,60 \pm 3,07$ pg/ml, obteniéndose la máxima concentración a las dos de la mañana $47,52 \pm 7,40$ pg/ml.

En el análisis estadístico no aparecieron variaciones significativas ($p > 0,05$), a lo largo del día.

Todos los valores obtenidos a lo largo del día para el 17β -estradiol están representados en la Tabla 6 (media \pm ES).

En la Gráfica 9 se detalla el patrón circadiano en la secreción de cortisol en los días cortos. Nuestro valor máximo se observó a las ocho de la mañana con una concentración de $129,76 \pm 10,75$ ng/ml. El nadir se producía a las ocho de la tarde, con un valor de $58,95 \pm 7,29$. Los valores sobre los que se construyó la gráfica aparecen reflejados en la Tabla 7.

El análisis de la varianza mostró diferencias significativas, en el test de Bonferroni y de Friedman, en la secreción de cortisol a lo largo del día ($p < 0,05$).

En la Gráfica 10 se representan las concentraciones de testosterona en los días largos, no encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), pero con unas variaciones muy semejantes a las obtenidas en los días cortos. En la Tabla 5 están recogidas las concentraciones de testosterona en los días largos.

En la Gráfica 11 están representadas las variaciones en la concentración de la hormona 17 β -estradiol en los días largos y observamos que tampoco existían variaciones estadísticamente significativas ($p > 0,05$). En la Tabla 6 aparecen los valores medios (media \pm ES) de esta hormona, a lo largo del día.

En la Gráfica 12 se muestra el patrón circadiano del cortisol para los días largos. La máxima concentración se obtuvo a las ocho de la mañana con un valor de $140,22 \pm 24,58$ ng/ml. El nadir se obtuvo a las once de la noche, con una concentración media de $66,73 \pm 12,71$ ng/ml. En la Tabla 7 quedan recogidas las concentraciones de esta hormona a lo largo del día.

Aparecieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la secreción de cortisol, en los días largos, en los dos test empleados.

En las Gráficas 13, 14 y 15 se pueden comparar las diferencias en las concentraciones de la testosterona, 17 β -estradiol y cortisol, respectivamente, en los días cortos y largos.

Encontramos diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones obtenidas en los días largos y cortos, en el caso de las dos primeras hormonas. En el caso de la testosterona, estas diferencias posiblemente se deban a variaciones en la concentración, más que a variaciones en el patrón.

TABLA 2.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS ANUALES DE 17 β -ESTRADIOL *

	43,00 \pm 6,61		116,58 \pm 21,94
	36,63 \pm 4,50		93,57 \pm 17,76
ENERO	37,55 \pm 4,57	JULIO	96,70 \pm 18,47
	40,83 \pm 3,13		105,13 \pm 19,94
	33,40 \pm 3,97		105,44 \pm 19,06
	40,55 \pm 4,71		79,80 \pm 14,79
FEBRERO	36,72 \pm 4,63	AGOSTO	87,67 \pm 15,83
	39,25 \pm 2,65		63,02 \pm 10,79
			54,80 \pm 9,45
	41,67 \pm 4,54		
	31,49 \pm 5,76		53,31 \pm 9,88
MARZO	22,40 \pm 2,97	SEPTIEMBRE	50,93 \pm 8,28
	20,23 \pm 2,51		47,52 \pm 6,18
	16,22 \pm 1,66		46,76 \pm 7,41
	26,63 \pm 4,22		44,40 \pm 7,26
	34,68 \pm 1,39		36,27 \pm 5,61
ABRIL	35,04 \pm 1,97	OCTUBRE	54,28 \pm 9,80
	36,36 \pm 3,14		47,92 \pm 7,23
	37,85 \pm 3,03		26,84 \pm 3,54
	29,20 \pm 2,45		37,63 \pm 5,59
MAYO	27,43 \pm 3,37	NOVIEMBRE	54,12 \pm 9,33
	28,47 \pm 4,18		38,44 \pm 5,97
			42,56 \pm 7,16
	23,34 \pm 2,78		
	57,58 \pm 10,08		37,29 \pm 6,83
JUNIO	111,65 \pm 19,48	DICIEMBRE	32,81 \pm 0,51
	112,33 \pm 18,26		31,58 \pm 4,98
	114,73 \pm 21,09		41,36 \pm 7,09

(*) Concentraciones de 17 β -estradiol expresadas en pg/ml

TABLA 3.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS ANUALES DE CORTISOL*

ENERO	117,17 ± 20,18	JULIO	87,96 ± 11,31
	75,93 ± 7,60		104,79 ± 19,45
	97,29 ± 9,36		85,00 ± 15,18
	89,45 ± 15,78		88,22 ± 15,59
FEBRERO	142,31 ± 27,45	AGOSTO	98,50 ± 17,45
	319,18 ± 53,10		92,64 ± 18,17
	249,70 ± 47,14		109,20 ± 19,18
	132,16 ± 25,21		124,32 ± 17,90
MARZO	98,65 ± 17,68	SEPTIEMBRE	147,72 ± 17,40
	68,94 ± 11,91		95,31 ± 15,82
	56,07 ± 9,37		83,35 ± 12,53
	78,65 ± 13,70		84,28 ± 13,51
ABRIL	100,43 ± 19,80	OCTUBRE	95,26 ± 16,20
	101,66 ± 19,03		103,68 ± 17,12
	118,91 ± 19,71		114,94 ± 13,60
	143,42 ± 28,87		84,89 ± 13,12
MAYO	83,55 ± 15,30	NOVIEMBRE	77,51 ± 9,60
	79,98 ± 11,84		76,21 ± 9,74
	80,76 ± 14,94		93,17 ± 17,87
	74,78 ± 13,97		175,46 ± 24,54
JUNIO	93,85 ± 14,95	DICIEMBRE	140,12 ± 26,64
	69,47 ± 9,97		103,02 ± 14,97
	113,10 ± 16,08		163,36 ± 30,18
	130,33 ± 25,95		187,25 ± 34,23
	188,27 ± 21,35		109,22 ± 16,59
	205,56 ± 39,79		98,73 ± 13,04

(*) Concentraciones de cortisol expresadas en ng/ml.

**TABLA 4.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS SEMANALES DE LAS
HORMONAS ESTEROIDES**

	TESTOSTERONA¹	ESTRADIOL²	CORTISOL³
DOMINGO	1,23 ± 0,19	39,35 ± 6,54	57,71 ± 10,03
LUNES	1,48 ± 0,28	40,78 ± 6,83	54,36 ± 10,45
MARTES	1,58 ± 0,23	39,53 ± 4,40	112,10 ± 14,80
MIÉRCOLES	1,34 ± 0,19	39,22 ± 6,00	84,16 ± 15,33
JUEVES	1,17 ± 0,13	29,00 ± 3,43	99,84 ± 17,07
VIERNES	1,02 ± 0,10	35,44 ± 4,64	93,80 ± 14,77
SÁBADO	0,92 ± 0,07	43,64 ± 7,40	87,36 ± 15,10

Concentraciones plasmáticas expresadas en: (1) ng/ml.; (2) pg/ml; (3) ng/ml.

TABLA 5.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE TESTOSTERONA*

	DIAS CORTOS	DIAS LARGOS
08:00	1,20 ± 0,24	2,05 ± 0,37
11:00	1,51 ± 0,30	2,61 ± 0,41
14:00	2,10 ± 0,36	2,74 ± 0,48
17:00	2,10 ± 0,13	2,79 ± 0,56
20:00	0,97 ± 0,10	1,95 ± 0,29
23:00	1,47 ± 0,11	2,14 ± 0,29
02:00	1,26 ± 0,17	2,32 ± 0,44
05:00	1,00 ± 0,08	1,86 ± 0,23
08:00	0,88 ± 0,10	1,74 ± 0,23
11:00	1,18 ± 0,10	2,25 ± 0,29

(*) Concentraciones expresadas en ng/ml.

TABLA 6.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE 17 β -ESTRADIOL *

	DIAS CORTOS	DIAS LARGOS
08:00	32,24 \pm 4,32	70,37 \pm 6,46
11:00	31,60 \pm 3,07	70,50 \pm 4,35
14:00	35,53 \pm 5,23	71,90 \pm 5,63
17:00	33,78 \pm 3,79	65,02 \pm 7,69
20:00	31,91 \pm 3,96	62,55 \pm 1,73
23:00	40,35 \pm 7,61	70,08 \pm 9,40
02:00	47,52 \pm 7,40	63,71 \pm 8,25
05:00	40,59 \pm 7,65	73,03 \pm 10,09
08:00	45,99 \pm 6,73	63,82 \pm 5,32
11:00	39,81 \pm 5,71	60,16 \pm 6,40

(*) Concentraciones expresadas en pg/ml.

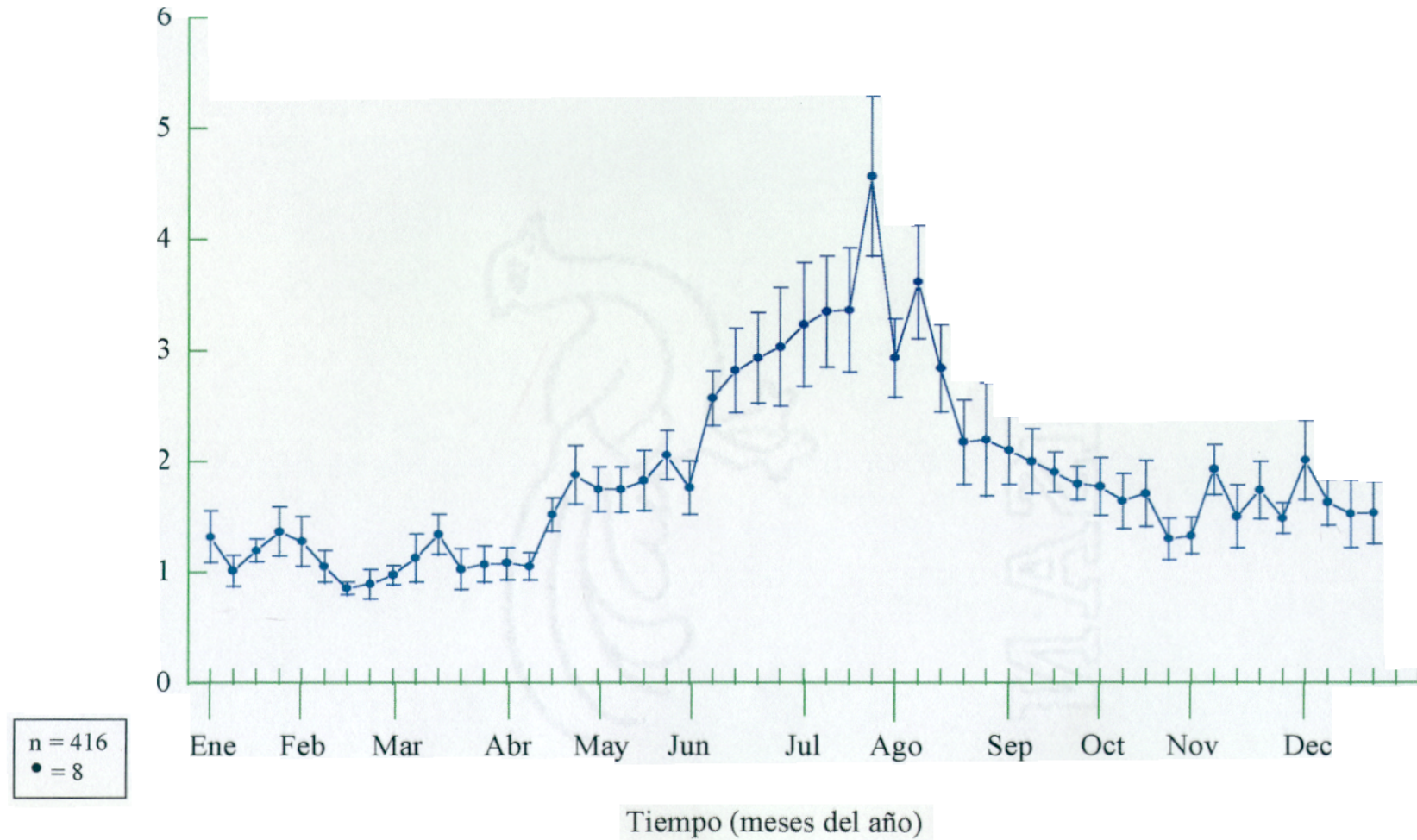
TABLA 7.- CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE CORTISOL *

	DIAS CORTOS	DIAS LARGOS
08:00	129,76 ± 10,75	140,22 ± 24,58
11:00	93,17 ± 17,87	117,49 ± 21,32
14:00	78,86 ± 13,65	109,86 ± 17,15
17:00	63,89 ± 6,41	71,77 ± 13,69
20:00	58,95 ± 7,29	79,43 ± 11,35
23:00	88,00 ± 8,92	66,73 ± 12,71
02:00	91,88 ± 10,39	82,71 ± 12,91
05:00	110,29 ± 13,70	101,57 ± 7,17
08:00	167,78 ± 18,75	149,76 ± 27,85
11:00	131,53 ± 23,78	87,84 ± 16,17

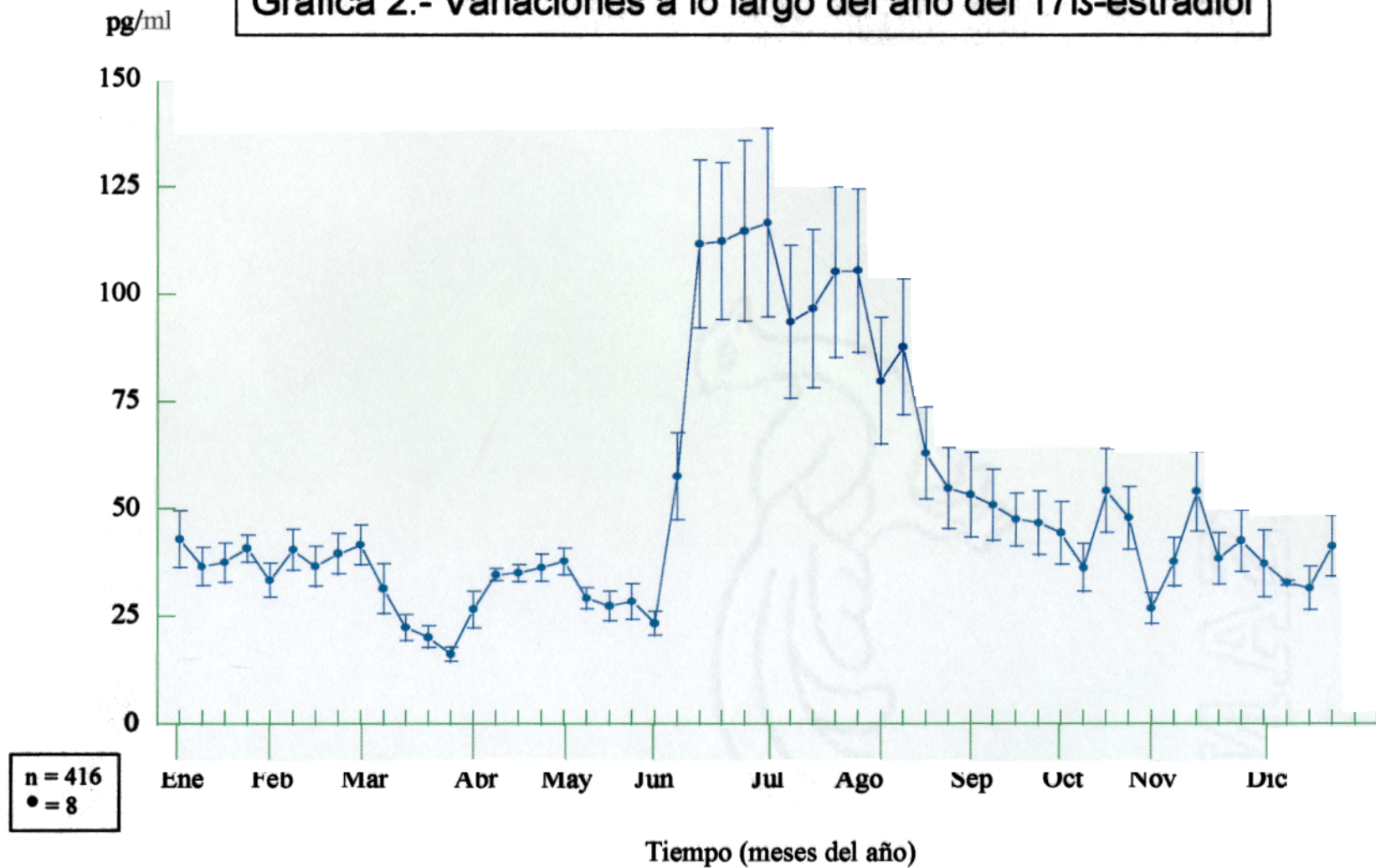
(*) Concentraciones expresadas en ng/ml.

ng/ml

Gráfica 1.- Variaciones a lo largo del año de la testosterona

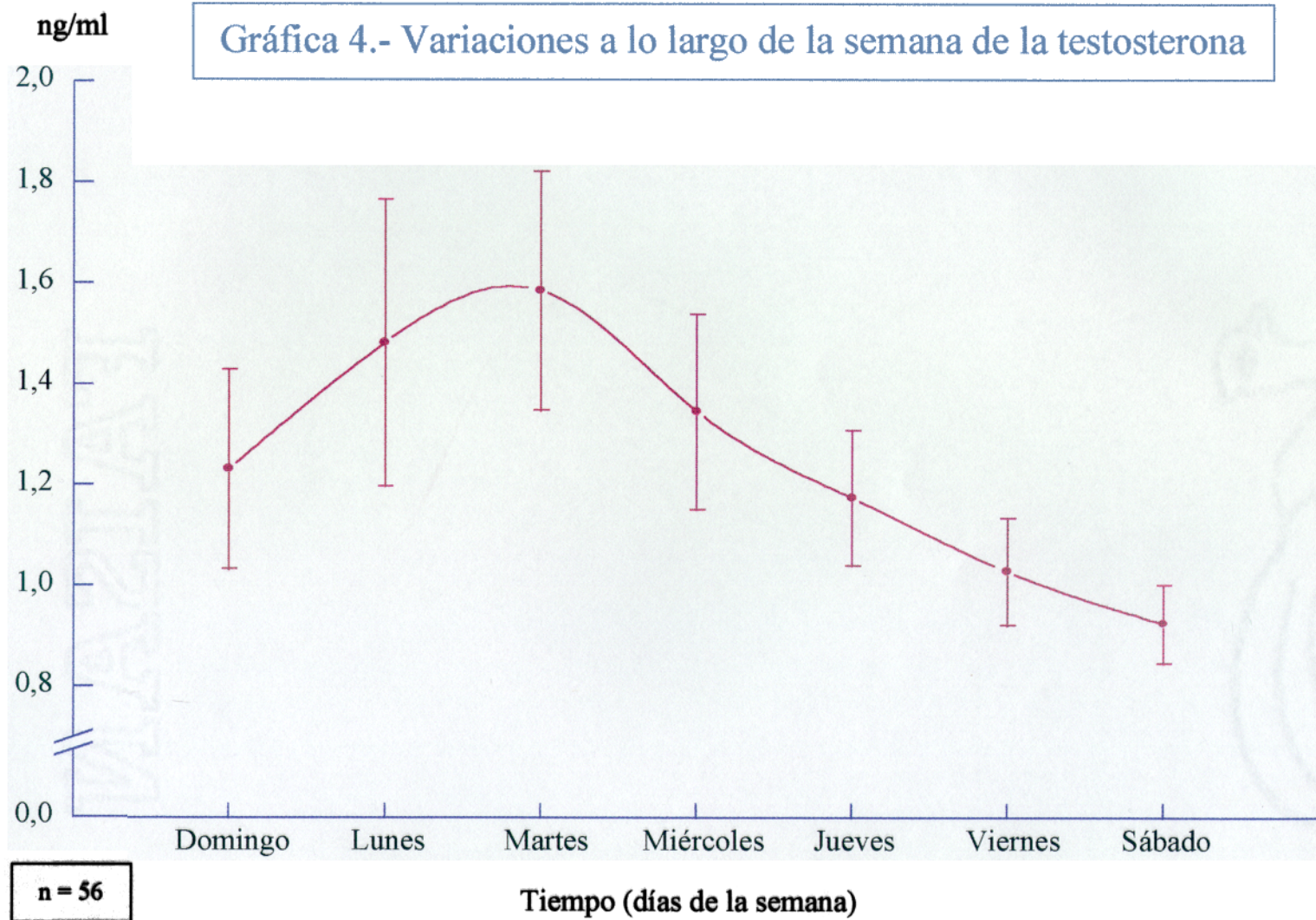


Gráfica 2.- Variaciones a lo largo del año del 17β -estradiol

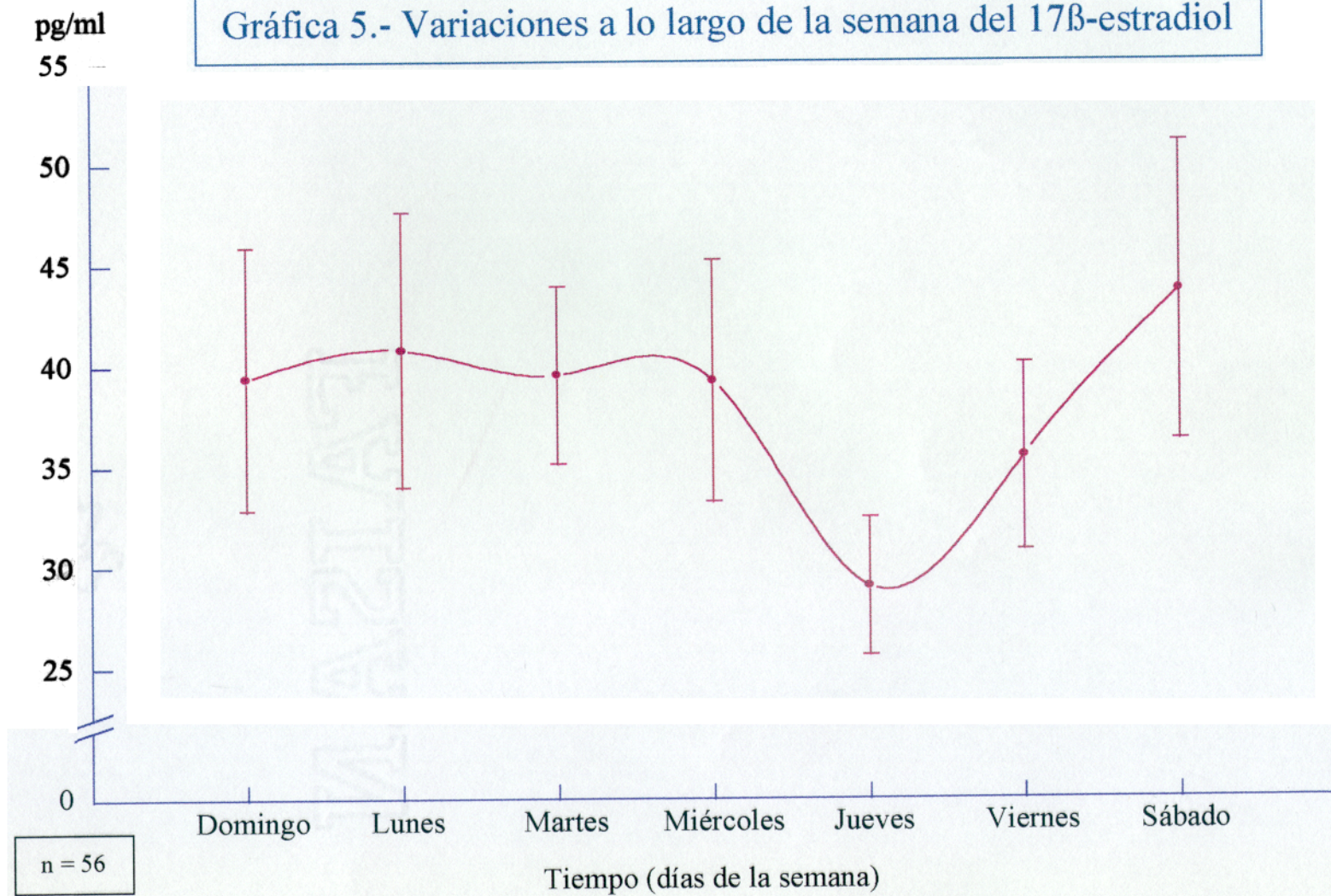


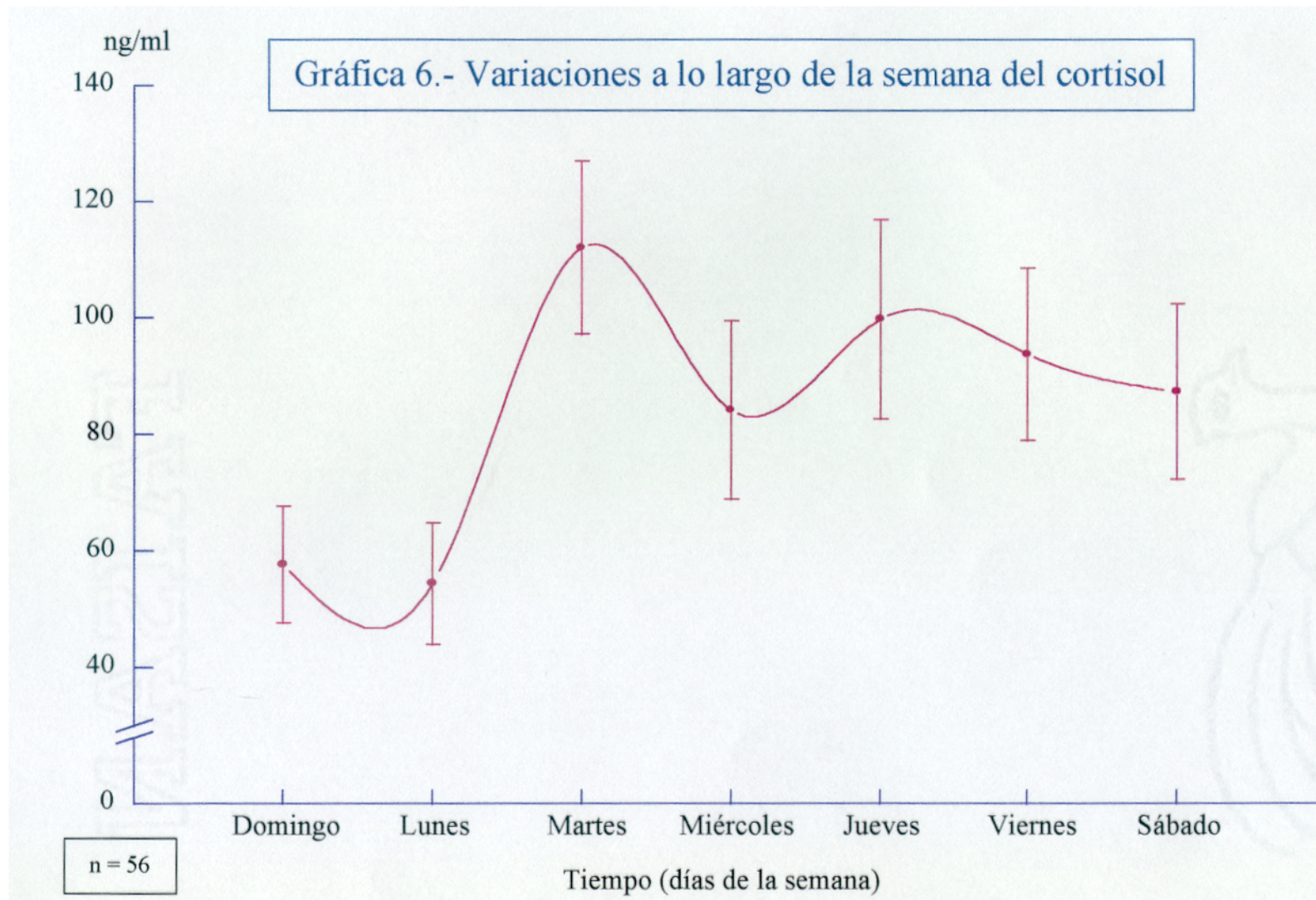
Gráfica 3.- Variaciones a lo largo del año del cortisol

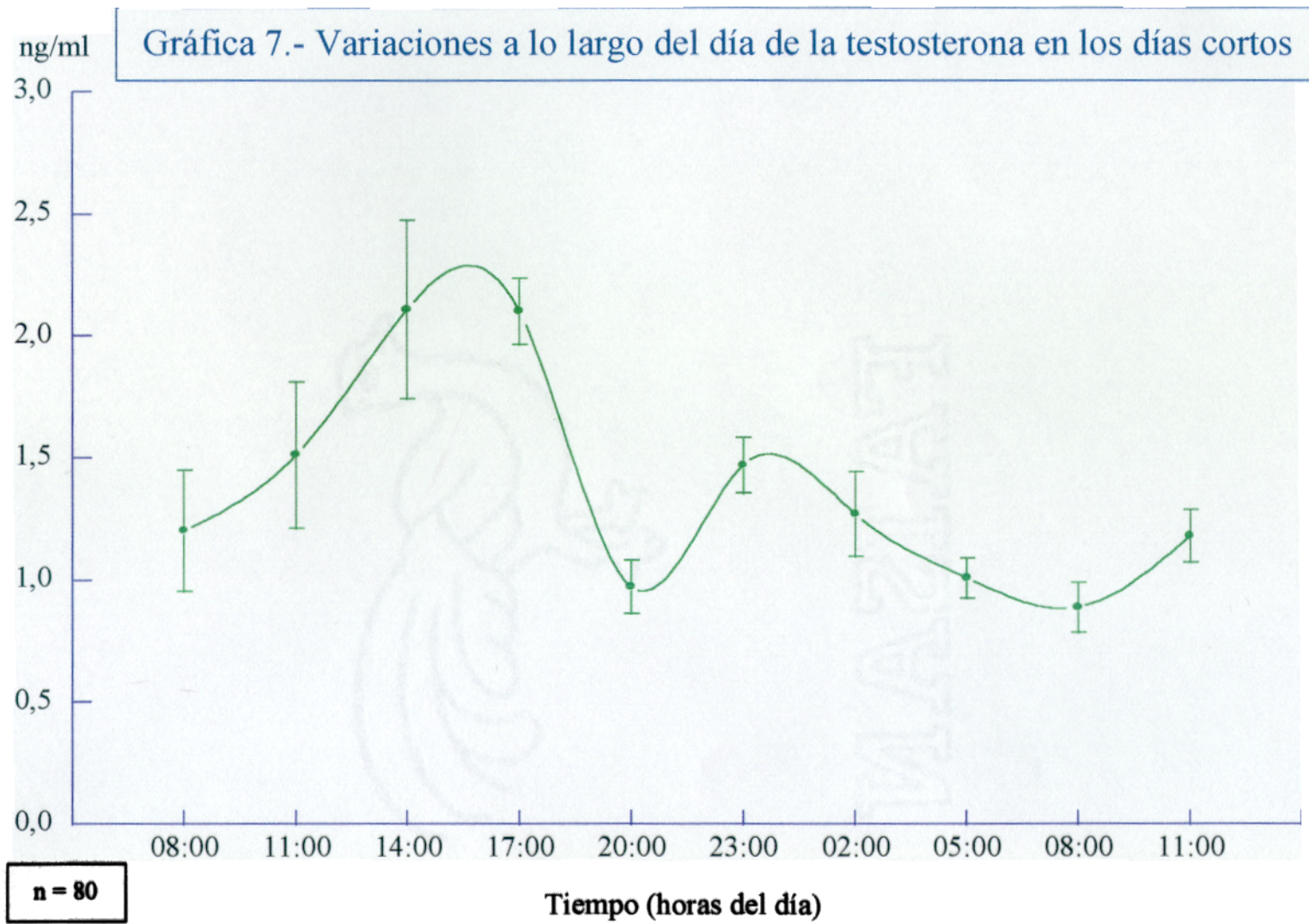


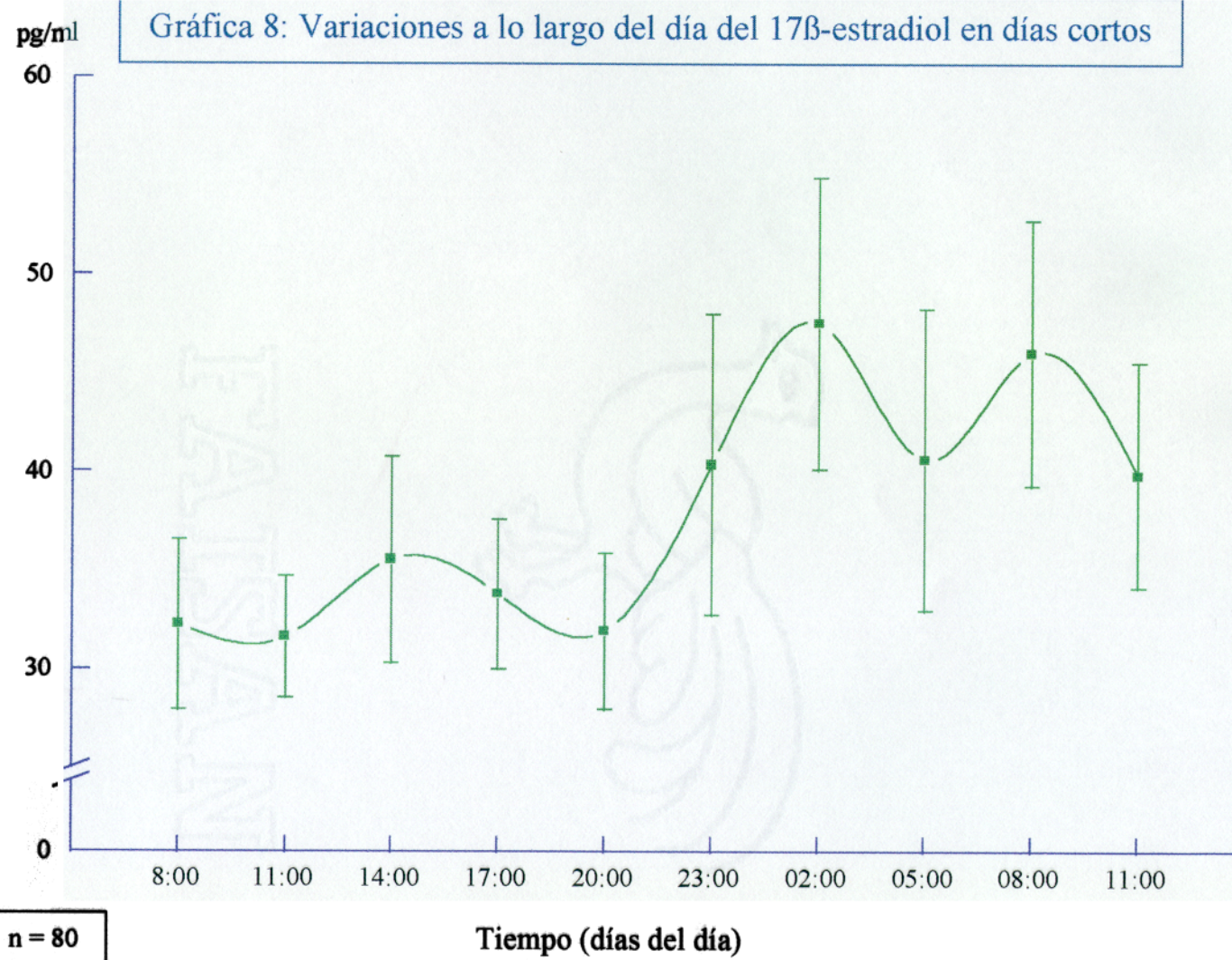


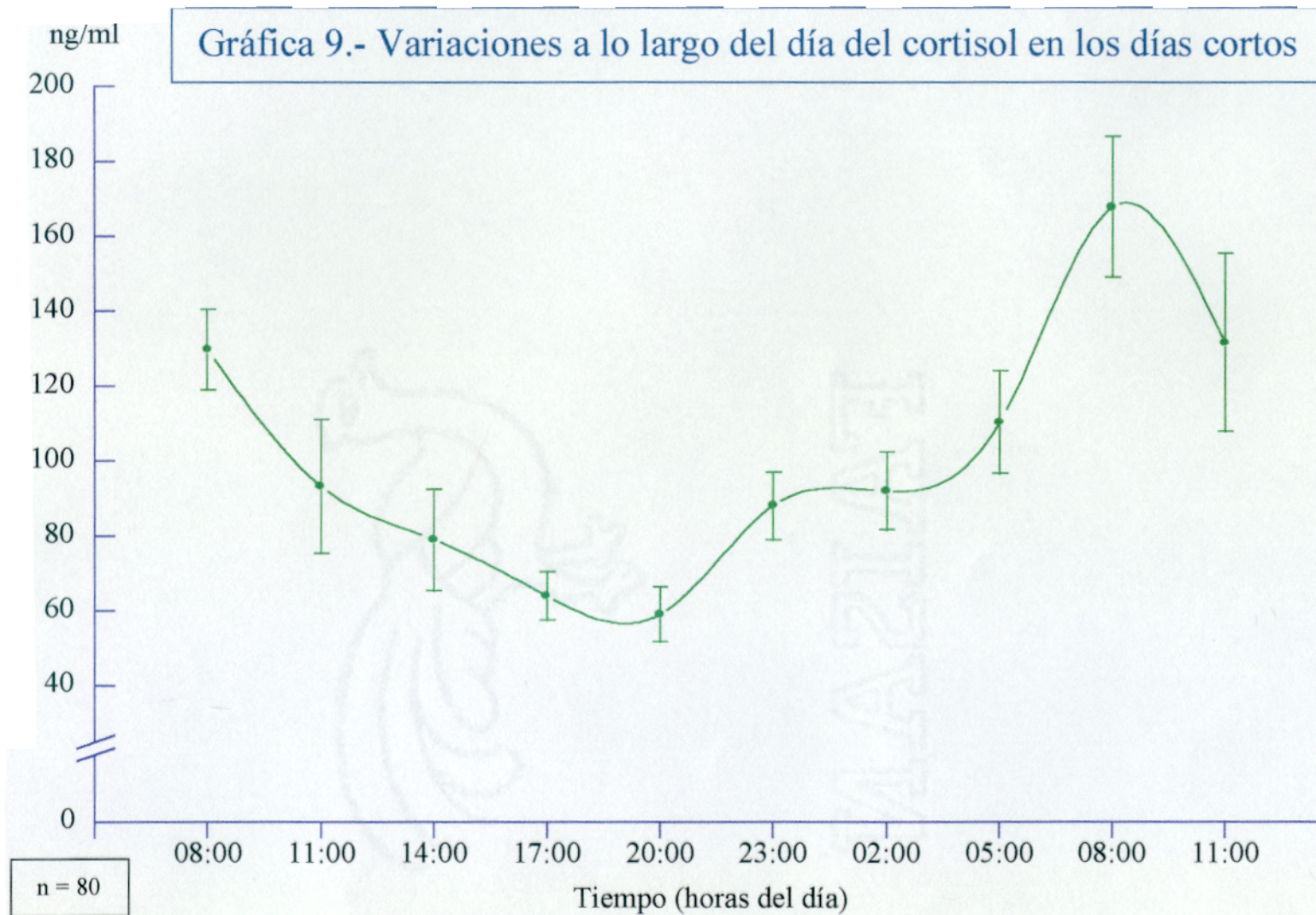
Gráfica 5.- Variaciones a lo largo de la semana del 17 β -estradiol

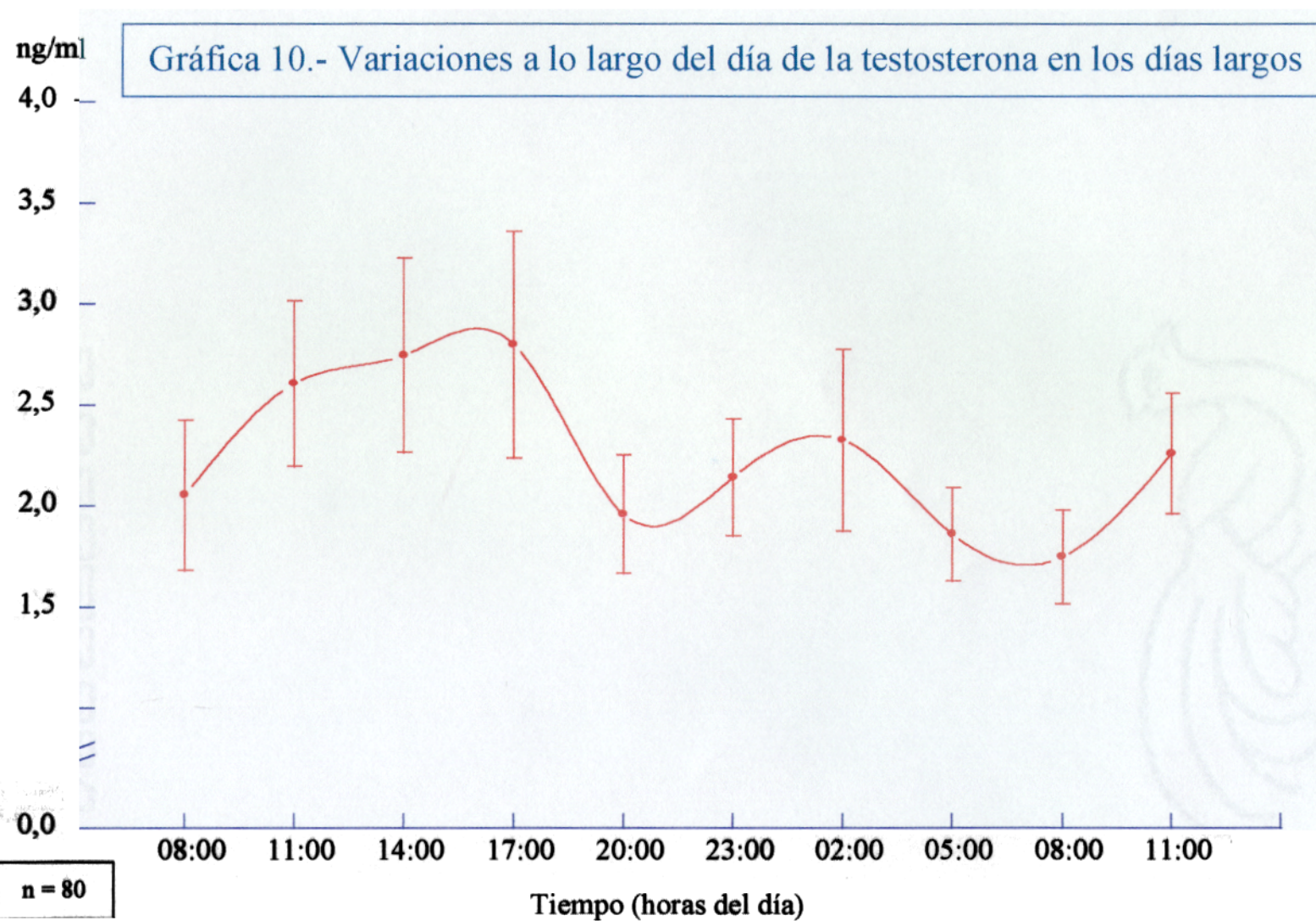




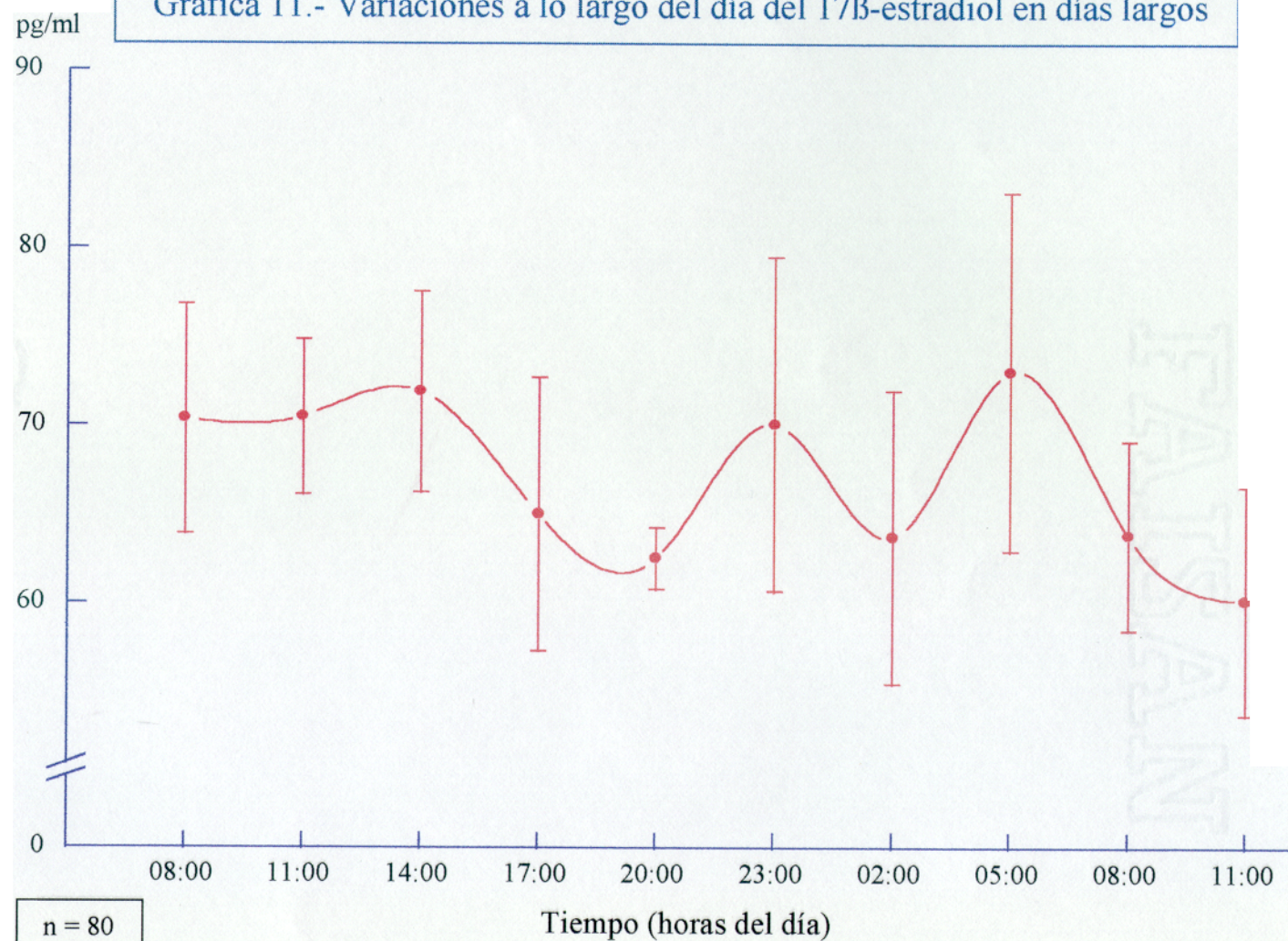


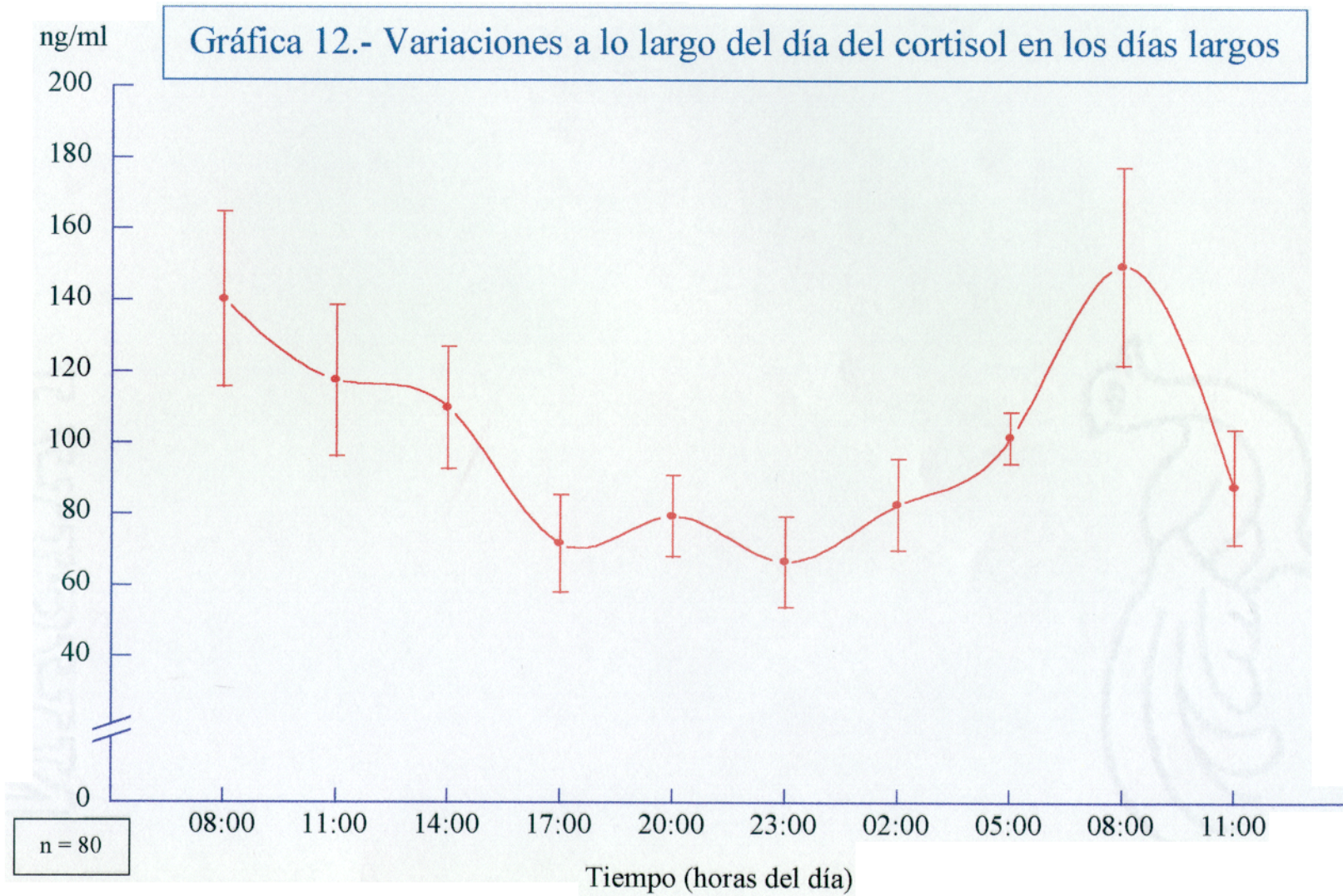


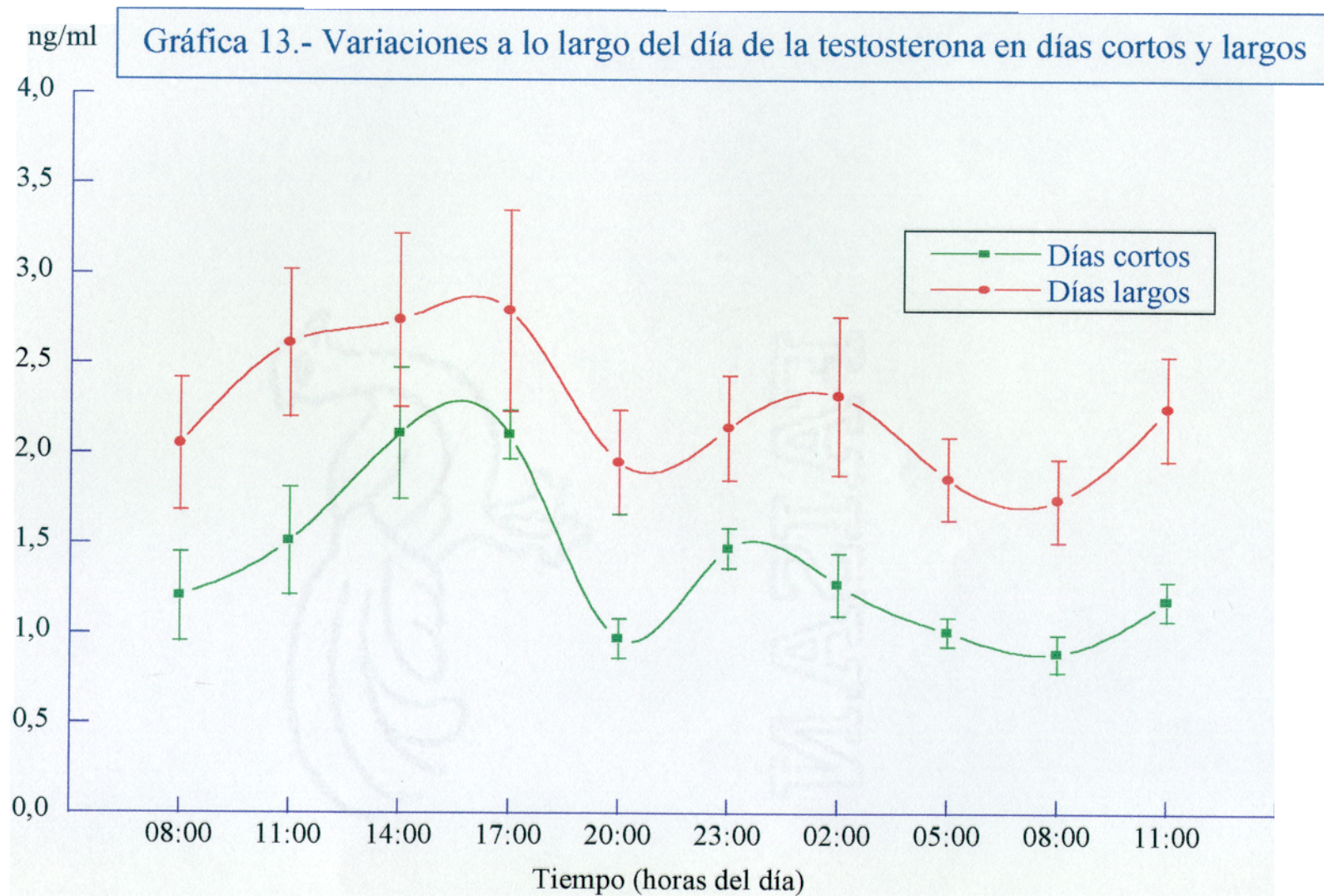




Gráfica 11.- Variaciones a lo largo del día del 17β -estradiol en días largos

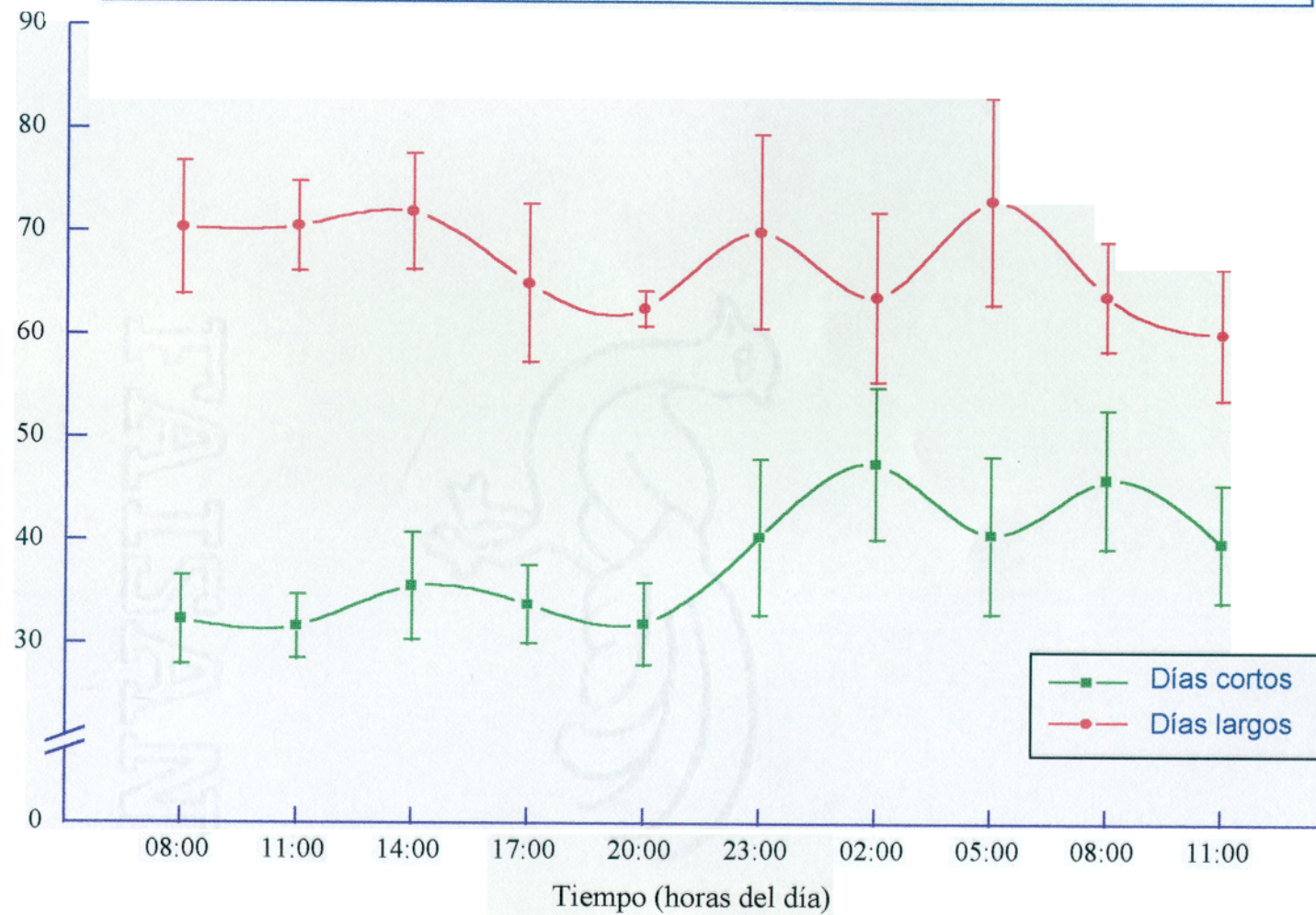




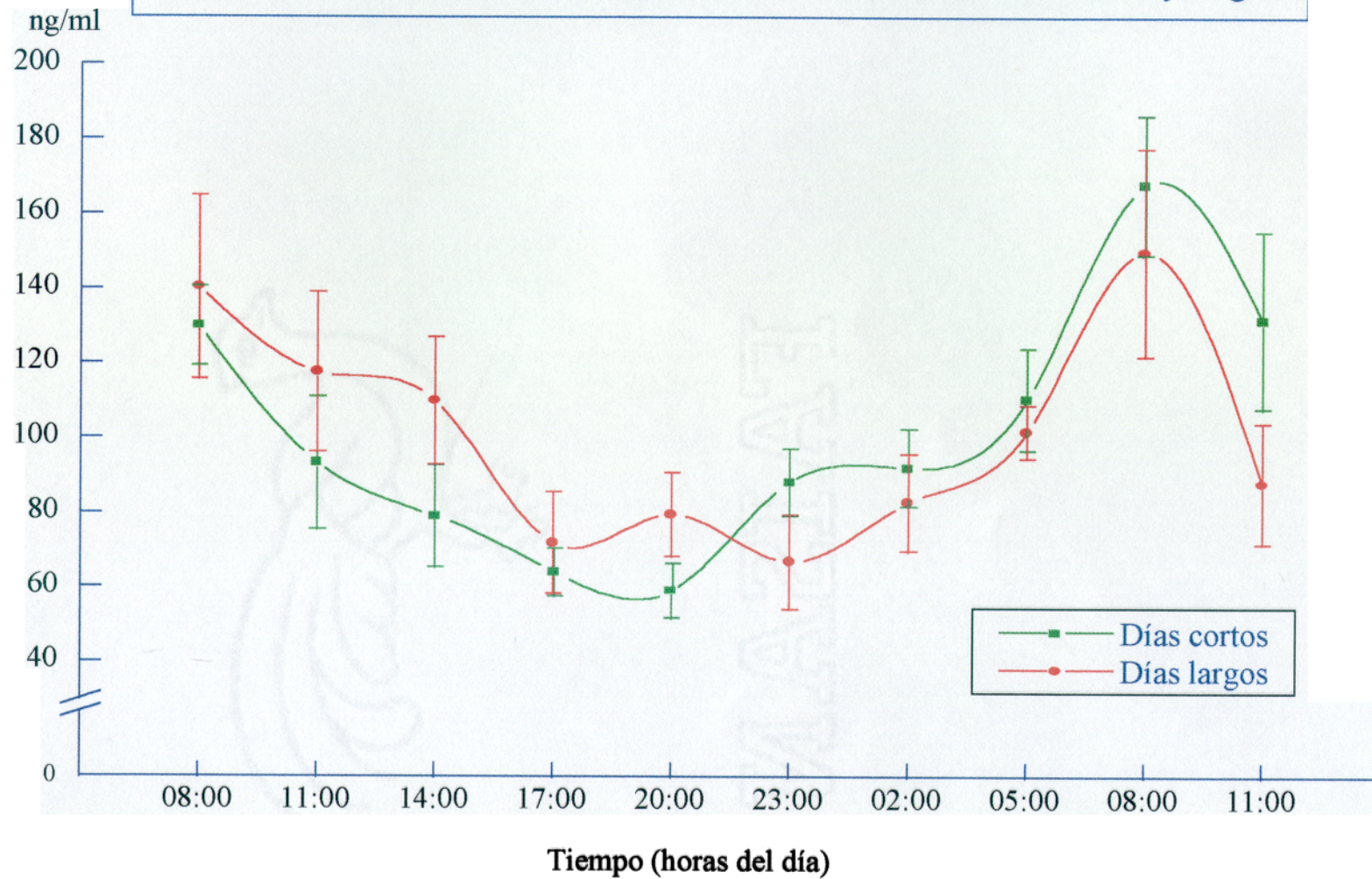


pg/ml

Gráfica 14.- Variaciones a lo largo del día del 17β -estradiol en días cortos y largos



Gráfica 15.- Variaciones a lo largo del día del cortisol en días cortos y largos



DISCUSSION

El diseño experimental se llevó a cabo siguiendo las directrices del Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y de acuerdo con el análisis estadístico que se iba a realizar (BMDP), con el fin de poder obtener unos resultados estadísticamente manejables, para lo cual se planificó cuidadosamente la elección de cada variable biológica. En el capítulo de material y métodos, se han señalado estas variables biológicas; sin embargo, nos parece importante recordarlas de nuevo, ya que a lo largo de este capítulo, discutiremos los criterios en los que nos hemos basado para la planificación y el desarrollo de nuestra experimentación.

Las variables biológicas utilizadas, fueron:

- Número de animales.
- Perfiles hormonales de testosterona (T), 17 β -estradiol (E₂) y cortisol (C).
- Hora y/o día de la toma de muestras.

La población de caballos de Pura Raza Española fue seleccionada siguiendo unos criterios determinados que fueron expuestos en el capítulo de material y métodos basados en la capacidad reproductora del animal. Los diferentes trabajos consultados emplean otras razas equinas, pero nosotros creímos oportuno emplear ésta, puesto que es la raza autóctona de España, que está cobrando gran interés en el resto del mundo.

En segundo lugar, una vez seleccionada la población de animales procedimos a la elección de la técnica analítica. Las concentraciones hormonales obtenidas pueden depender de la técnica analítica que se utilice. Existen una gran variedad de técnicas inmunológicas capaces de detectar cantidades mínimas de hormonas, por lo que su utilización es cada vez mayor. Dentro de las técnicas inmunológicas el radioinmunoanálisis (RIA) ha sido la más empleada, utilizándose para la medición de diversas hormonas como por ejemplo, el 17 β -estradiol (Abraham, 1969) y la testosterona (Sheldon y Coppenger, 1977). Sin embargo, esta técnica posee unos inconvenientes, como son la utilización de sustancias radiactivas, la necesidad de personal altamente cualificado, etc., que han ido abriendo paso a una serie de técnicas inmunológicas para las determinaciones hormonales en las que se sustituyen los

isótopos por otras sustancias marcadoras. De entre todas las técnicas empleadas, el enzimoimmunoanálisis (EIA) ha constituido la más clara alternativa al RIA introduciéndose a principios de los setenta (Van Weemen y Schuurs, 1972). Este método no sólo se utiliza en investigación, sino que ha sido enfocado hacia el diagnóstico práctico, lo que hace que la aplicación de estas técnicas en endocrinología veterinaria sea muy interesante (Schuurs y Van Weemen, 1980; Inoue *et al.*, 1993).

Una vez evaluadas y comparadas las características de los distintos métodos enzimoimmunológicos para el análisis hormonal, nos decidimos por el EIA de competición en microplaca, debido a que es el más utilizado para la determinación de hormonas de bajo peso molecular, además de la posibilidad de adaptarlos para pruebas de campo, lo cual nos pareció de suma importancia (Silván *et al.*, 1991). Tras estandarizar la técnica analítica (Illera *et al.*, 1993a,b), se procedió al análisis de las muestras y posterior estudio estadístico de las concentraciones hormonales.

La concentración de una hormona en el plasma procedente de la vena yugular es, en la mayoría de los casos, un claro reflejo de la secreción de esa hormona, de forma que, cambios significativos en la concentración plasmática, representan cambios en la secreción de esa hormona.

Inoue *et al.* (1993), sugirieron que los niveles séricos de testosterona y estrógenos totales podrían informarnos acerca de la función endocrina del semental equino, ya que, animales castrados y de menos de quince meses de edad, tenían unas concentraciones de testosterona y de estrógenos menores que las obtenidas en animales adultos, por lo que se puede afirmar que una variación en los perfiles hormonales podrían estar asociados con una disminución de la fertilidad, siendo posible identificar hormonalmente al semental. Muchos de los ensayos utilizados para detectar anomalías en la reproducción se basan en la medición de los niveles de testosterona en sangre periférica (Ganjam y Kenney, 1975; Gangel *et al.*, 1987; Stabenfeldt y Hughes, 1980 y Silberzahn *et al.*, 1989). Así, Cox (1975) y Cox *et al.* (1973, 1986), afirmó que animales con una concentración de testosterona mayor de 100 pg/ml, poseían tejido testicular, los que tenían 40 pg/ml carecían de él y los que se

encontraban entre los dos niveles debían ser tratados como criptórquidos hasta repetir las pruebas.

Dentro de la funcionalidad gonadal, la regulación estacional de la reproducción en los mamíferos es un proceso muy complejo que envuelve varias vías fisiológicas y diversos factores externos, tales como los ambientales. Es probable que los cambios anuales en la capacidad reproductora del semental, sean el resultado de la presencia de un ciclo anual endógeno en la función testicular que estaría sincronizado por un *zeitgeber* que en nuestro caso sería el cambio en el fotoperíodo. Al igual que a lo largo del año existen cambios en la duración del fotoperíodo que conllevan variaciones circanuales en las concentraciones hormonales, éstos también también acarrearán alternancias en la duración de la luz y la oscuridad a través de meses, semanas y días que componen un año produciendo variaciones circatrigintanas, circaseptanas y circadianas de los niveles hormonales, respectivamente.

Muchos de los estudios realizados en sementales a lo largo de un año, demuestran la influencia de este fotoperíodo sobre la producción gonadal de testosterona (Berndtson *et al.*, 1974; Harris *et al.*, 1983; Thompson *et al.*, 1985; Cox *et al.*, 1988; Clay *et al.*, 1988; Floris *et al.*, 1989). De todos los estudios realizados en caballos no existe referencia alguna acerca de las concentraciones, ni de los distintos patrones de secreción de testosterona en el semental de Pura Raza Española.

En la Tabla 8 aparecen los valores de testosterona obtenidos por distintos autores, coincidiendo todos ellos en la aparición de variaciones estacionales significativas en la concentración de testosterona.

TABLA 8
NIVELES DE TESTOSTERONA EN LA ESPECIE EQUINA

AUTORES	[T _{max}]	[T _m]	[T _{min}]
Cox <i>et al.</i> , 1973			0,8
Berndston <i>et al.</i> , 1974	3,2		1,5
Cox y Williams, 1975	primavera		
Ganjan y Kenney, 1975		2,1	
Raeside <i>et al.</i> , 1978	1,1		0,2
Byers <i>et al.</i> , 1983			0,2
Harris <i>et al.</i> , 1983	3,0		0,6
Wallach <i>et al.</i> , 1983	2,0		0,6
Irvine <i>et al.</i> , 1985	1,4		0,7
Cox <i>et al.</i> , 1986	1,0-2,0		0,2
García <i>et al.</i> , 1987	7,0		2,5
Clay <i>et al.</i> , 1988	3,6		1,7
Cox <i>et al.</i> , 1988	mayo		
Floris <i>et al.</i> , 1989	1,3		0,2
Clay y Clay, 1992		3,6	
Douglas y Umphenour, 1992	1,7		0,6
Mc Donnell y Murray, 1995	2,5		0,5

[T_{max}] Concentración máxima de testosterona. [T_{med}] Concentración media de testosterona. [T_{min}] Concentración mínima de testosterona. Todas las concentraciones están expresadas en ng/ml.

De acuerdo con estos autores, hemos observado que la testosterona es una hormona altamente estacional, que sigue un patrón circanual que está reflejado en la Gráfica 1, y demostrado estadísticamente ($p < 0,05$). La testosterona en los sementales de Pura Raza Española comienza a ascender rápidamente desde el mes de abril hasta presentar la concentración máxima en el mes de julio, más concretamente, la última semana ($4,57 \pm 0,73$ ng/ml), descendiendo bruscamente hasta octubre. A partir de este momento la testosterona se mantiene aproximadamente en los mismos niveles con pequeñas fluctuaciones semanales durante los meses de octubre, noviembre y diciembre, para descender y obtener la concentración mínima en el mes de febrero ($1,01 \pm 0,10$ ng/ml), momento en el cual comienza un ascenso paulatino hasta el mes de abril. El nadir corresponde a la tercera semana de febrero, con una concentración de $0,85 \pm 0,05$ ng/ml. La razón de por qué la testosterona aumenta bruscamente desde abril, posiblemente se deba a dos hechos: el primero sería la influencia favorable del fotoperíodo y el segundo, el mayor número de

hembras en celo a partir del mes de abril como se demuestra en otras especies, como por ejemplo en el koala (Cleva *et al.*, 1994). Por otro lado, la aparición de la máxima concentración la última semana de julio pudiera responder a la finalización del período de monta, puesto que a partir de este momento la concentración decae bruscamente, bien por el efecto de retrofuncionalidad negativa ante el exceso de testosterona o bien por la aparición de fotoperíodos no estimulatorios, tanto para la hembra como para el macho.

En 1974, Berndtson *et al.*, estudiaron el carácter estacional de la hormona testosterona, obteniendo las concentraciones más altas en el mes de mayo y un nadir los meses de octubre, diciembre y enero, con un ligero ascenso en noviembre, lo cual coincide con nuestras fluctuaciones correspondientes al mes de noviembre. Douglas y Umphenour (1992), obtuvieron las máximas concentraciones de testosterona en febrero, siendo éstas muy similares a las de abril, y observaron las mínimas en noviembre. En este mes, nosotros observamos unos niveles mínimos si los comparamos con los obtenidos durante los meses de verano (junio, julio, agosto y septiembre).

Las variaciones estacionales en la libido y la actividad secretora y gametogénica del tracto reproductor del semental están mediadas, al menos parcialmente, por el patrón de secreción de la testosterona, la cual está claramente influenciada por la estación climática del año. Los mecanismos fisiológicos por los que cambios en el fotoperíodo alteran la función testicular e inducen al patrón comportamental típico de la condición reproductora comienzan a conocerse en la actualidad, aunque continúan siendo estudiados. Se piensa que el eje hipotálamo-hipofisario permanece latente bajo la influencia de fotoperíodos no estimulatorios (días cortos) y este estado es debido, en un gran número de mamíferos, al efecto que producen las secreciones hormonales de la glándula pineal. Según Byers *et al.* (1983), la abolición de esta inhibición por los efectos estimulatorios de los días largos permite la secreción de LH y FSH, las cuales actúan sobre el testículo estimulando la producción de andrógenos y la espermatogénesis. La razón por la que los niveles de testosterona durante los meses de octubre, noviembre y diciembre no eran los mínimos esperados, pudiera ser la presencia de algunas hembras en celo.

Una vez determinado el patrón circanual de la testosterona, se procedió a estudiar las concentraciones hormonales anuales de 17β -estradiol debido a que gran cantidad de los estrógenos circulantes en el semental proceden de la aromatización testicular de la testosterona en la fracción microsomal por la pérdida de 1β , 2β , átomos de hidrógeno (Gaillard y Silberzahn, 1987).

Douglas y Umphenour (1992), determinaron que unas concentraciones bajas de estrógenos totales podrían estar presentes en sementales con una libido inadecuada. Pero unas concentraciones bajas de estrógenos totales, frecuentemente preceden a una disminución en la fertilidad del semental y animales con bajas concentraciones de estrógenos totales, y una alta concentración de FSH, tienden a padecer degeneración testicular evidente. Wallach *et al.* (1983) observaron que unas concentraciones bajas de estradiol en sementales con una libido deficiente podrían ser el resultado de una disminución en la producción de estradiol por parte del testículo, una disminución en la aromatización extratesticular de la testosterona o una rápida metabolización del estradiol.

Los niveles de estrógenos en el caballo han sido descritos en múltiples estudios, pero existe una gran divergencia en cuanto a concentraciones plasmáticas medias, ya que el margen citado por los autores oscila desde pg/ml (Wallach *et al.*, 1983) a ng/ml (Silberzahn *et al.*, 1989), por lo que para esta especie animal es muy difícil poder considerar un margen fisiológico para el 17β -estradiol.

Las variaciones en las concentraciones de estradiol no han sido determinadas en el caballo de Pura Raza Española. Tras el análisis de nuestros datos pudimos determinar la existencia de variaciones estadísticamente significativas del 17β -estradiol a lo largo del año ($p < 0,05$) confirmándose así la existencia de un patrón circanual para esta hormona en el semental de esta raza (Gráfica 2). Como se observa, los primeros meses del año, el estradiol se mantiene, más o menos, constante excepto durante el mes de marzo en el que se observa un descenso hasta el mes de junio, donde se produce un ascenso brusco manteniéndose en niveles elevados durante todo el mes, para alcanzar el pico la primera semana de julio ($116,58 \pm 21,94$ pg/ml). Seguidamente, comienza un descenso paulatino hasta el último

mes del año. Teniendo lugar el nadir la última semana de marzo ($16,22 \pm 1,66$ pg/ml), coincidiendo con la menor concentración media mensual ($26,4 \pm 2,87$ pg/ml), valores muy similares a los expresados por Wallach *et al.* (1983) en el mes de abril (26,2 pg/ml). Asimismo las concentraciones observadas durante los meses de enero y febrero coinciden con las obtenidas por Ganjam y Kenney (1975) (43,9 pg/ml) si bien éstos no especificaron el momento del año en el cual se realizó la toma de muestras. Thompson *et al.* (1978), analizaron los valores de 17β -estradiol en caballos de distintas razas, a lo largo del año y observaron que las concentraciones mínimas ocurrían en marzo y los máximos niveles los obtenían durante el mes de mayo coincidiendo con una elevación en nuestros resultados (Gráfica 2), aunque nuestras concentraciones máximas las obtuvimos un mes más tarde. Los resultados observados en los sementales de Pura Raza Española coinciden con los encontrados por los autores citados anteriormente, en cuanto al mes de presentación de las concentraciones mínimas, aunque los niveles observados son menores.

Las concentraciones máximas de 17β -estradiol coinciden con las máximas de testosterona en el mes de julio (Gráficas 1 y 2), apreciándose una cierta similitud en el trazado de ambos patrones circanuales. Si bien las concentraciones mínimas difieren en un mes, mientras que los mínimos niveles de testosterona se producen en el mes de febrero, los mínimos del estradiol ocurren en el mes de marzo. Posiblemente esto sea debido a que la mayor parte del estradiol circulante proviene de la aromatización de andrógenos a nivel testicular (Ganjam y Kenney, 1975) y a la influencia de la glándula adrenal (Nett, 1993b).

Debido a la existencia de diferencias en cuanto a la aparición de la concentración mínima en la testosterona y el 17β -estradiol, estudiamos las posibles correlaciones entre estas dos hormonas, obteniendo un coeficiente de correlación $r = + 0,906$ altamente significativo ($p < 0,001$) demostrando la influencia que una hormona presenta sobre la aparición de la otra, si bien Thompson *et al.* (1978) no observaron relación alguna entre estrógenos y andrógenos en el caballo, junto con otros autores (Cox y Williams, 1975; Ganjam y Kenney, 1975).

De la posible influencia de la glándula adrenal sobre la producción gonadal, según lo descrito anteriormente, ya que los sementales de Pura Raza Española, junto con otras razas, son animales muy sensibles al manejo, quisimos comprobar si esto se reflejaba en los niveles de cortisol y si éstos influían de alguna forma en la producción de estrógenos y andrógenos a nivel testicular.

El ritmo de los corticosteroides adrenales ha sido ampliamente estudiado en diferentes especies (Halberg, 1969; Weitzman *et al.*, 1971; Dalle *et al.*, 1980; Fujieda *et al.*, 1982; Garris, 1986; Monfort *et al.*, 1993), y en caballos de diferentes razas (Tabla VI), pero no en el caballo de Pura Raza Española. En el caballo, el cortisol es el corticosteroide secretado en mayor proporción, seguido por la cortisona, corticosterona y deoxicorticosterona (Zolovick *et al.*, 1966).

Las concentraciones de cortisol que aparecen en la bibliografía consultada son muy dispares. En la Tabla 9 están reflejados los distintos niveles de cortisol plasmático determinadas por los distintos autores.

TABLA 9
NIVELES DE CORTISOL EN LA ESPECIE EQUINA

AUTORES	[C _{max}]	[C _m]	[C _{min}]
Bottoms <i>et al.</i> , 1972	28,0	137,0	5,0
Larsson <i>et al.</i> , 1979	65,0	42,0	20,0
Flinsinska <i>et al.</i> , 1974	127,0	114,0	108,0
Eiler <i>et al.</i> , 1979		94,0	
Kumar <i>et al.</i> , 1976	31,7		19,6
Glaridon y Schatzmann, 1982	63,4		22,0
Hoffsis <i>et al.</i> , 1970		150,0	
Guthrie <i>et al.</i> , 1980	177,0		35,2
Baker <i>et al.</i> , 1982		23,9	
Tamanini <i>et al.</i> , 1983	46,0		34,0
Bossut <i>et al.</i> , 1983		52,0	
Irvine y Alexander, 1987		48,0	
Alexander <i>et al.</i> , 1991		187,3	
Colborn <i>et al.</i> , 1991a		26,6	
Colborn <i>et al.</i> , 1991b		28,0	

[C_{max}]. Concentración máxima de cortisol. [C_m]. Concentración media de cortisol. [C_{min}]. Concentración mínima de cortisol. Todas las concentraciones están expresadas en ng/ml.

En el estudio que hemos realizado a lo largo de un año, hemos encontrado grandes variaciones en la secreción de cortisol, las cuales son significativas ($p < 0,05$) y confirman la existencia de un patrón circanual representado en la Grafica 3. La concentración máxima de cortisol correspondía a la segunda semana del mes de febrero, con valores de $319,18 \pm 53,10$ ng/ml y la concentración mínima correspondía a la tercera semana del mes de marzo ($56,07 \pm 9,37$ ng/ml). El cortisol es una hormona que está influenciada por múltiples factores externos como son el propio manejo, el ejercicio, la época del año, la presencia/ausencia de hembras en celo, etc., por lo que las fluctuaciones del cortisol observadas a lo largo del año, podrían ser un reflejo de estos factores. Se observaron seis picos de máxima concentración a lo largo del año, que se corresponden con los meses de febrero, abril, junio, agosto, octubre y diciembre, por lo que también podríamos afirmar que existe, además, un patrón bimensual en la secreción de cortisol. La máxima concentración obtenida, en el mes de febrero, coincide con el comienzo de la estación reproductora en el hemisferio norte, donde está realizado nuestro estudio, si bien la verdadera estación

ovulatoria es en abril donde aparece el segundo pico. La aparición de algunas hembras de Pura Raza Española en el mes de octubre, como ya hemos indicado anteriormente, se correspondería con la elevación del mes de octubre, coincidiendo con lo obtenido por Borg *et al.* (1992) en la especie ovina durante la estación de otoño y verano.

Amirat y Brudieux (1993) encontraron que, en roedores del desierto de Argelia (*Psammomys obesus*), durante el otoño se producía un aumento en la sensibilidad de la glándula adrenal a la ACTH aumentando la secreción de cortisol hasta febrero coincidiendo con los máximos niveles de cortisol obtenidos en el semental de Pura Raza Española. Levin *et al.* (1994) estudiaron la ritmicidad del cortisol en individuos que provenían de distintos países y que no estaban adaptados a las condiciones extremas de luz/oscuridad en el interior de Alaska, encontrando un ritmo estacional en la secreción de esta hormona con los niveles máximos en otoño debido a la menor duración del día.

Todos los autores consultados observaron un único máximo que aparece en distintas épocas del año, posiblemente debido a que su toma de muestras normalmente se realizaba una vez por estación. Nuestro tipo de extracción permitió observar un segundo pico algo menor que el del mes de febrero, en abril ($143,42 \pm 28,87$ ng/ml), que coincide con el comienzo de la estación ovulatoria en el hemisferio norte, y posteriormente otro algo mayor en el mes de junio ($205,56 \pm 39,79$ ng/ml), mes en el cual nuestros caballos aun seguían montando, lo cual influía claramente en los niveles de cortisol. Según nuestros resultados podríamos decir que el cortisol sigue, además, un patrón bimensual con concentraciones elevadas aproximadamente cada dos meses.

Tras obtener los patrones circanuales de las tres hormonas, continuamos el estudio para ver la posible existencia de patrones circaseptanos para las mismas, ya que éstos han sido observados en diferentes parámetros fisiológicos, como en la presión sanguínea de recién nacidos en las tres primeras semanas de vida. Ya en la antigüedad Hipócrates, Galeno y Avicena, observaron que aproximadamente cada 7 días se observaba un aumento de la temperatura en individuos enfermos y actualmente el estudio de estos ritmos está cobrando gran importancia sobre todo en terapias antitumorales. Estos ritmos podrían estar asociados

a la rutina semanal, así, por ejemplo, el mayor índice de morbilidad/mortalidad por infarto de miocardio se produce los viernes (Cornélissen y Halberg, 1994).

En el semental de Pura Raza Española se observan, además del ciclo circanual, variaciones semanales en la concentración de testosterona. En la Gráfica 4 quedan reflejadas estas variaciones con concentraciones elevadas a comienzos de la semana y niveles mínimos a finales de la misma. La concentración máxima ocurre los martes ($1,58 \pm 0,23$ ng/ml) y la mínima los viernes ($0,92$ ng/ml $\pm 0,07$ ng/ml).

El patrón circaseptano de la testosterona queda demostrado de forma estadística mediante un análisis de la varianza obteniendo una significación de $p < 0,05$.

Al igual que con la testosterona, observamos una variación de aproximadamente siete días en la secreción de 17β -estradiol (Gráfica 5), con concentraciones máximas los sábados, con $43,64 \pm 7,40$ pg/ml y mínimas los jueves, con $29,00 \pm 3,43$ pg/ml. Este hecho queda demostrado de forma significativa ($p < 0,05$), lo que nos indica que la semana siguiente es muy probable que volvamos a observar unos niveles elevados durante el fin de semana y mínimos a mediados de la misma.

Estas variaciones a lo largo de la semana, tanto en la testosterona como en el estradiol, pueden tener un origen endógeno, pero están influenciadas por el “manejo” de los animales, que también influye de forma importante en los niveles de cortisol. En el estudio realizado a lo largo de una semana, de nuevo aparecieron variaciones significativas en la secreción de cortisol ($p < 0,05$) demostrando la existencia de un patrón circaseptano para la hormona cortisol. En la Gráfica 6 se observan dos picos y no uno como sucedió con las otras dos hormonas. La concentración máxima se obtuvo el martes, con unos niveles de $112,10 \pm 14,80$ ng/ml, y el segundo máximo apareció el jueves con niveles de $99,84 \pm 17,07$.

Ninguno de estos patrones circaseptanos ha podido ser contrastado debido a la ausencia de estudios similares si bien, los niveles están siempre dentro de los rangos

descritos para cada una de las hormonas estudiadas.

Ganjam, en 1975, observó variaciones episódicas en las concentraciones de los andrógenos, estrógenos y corticoides plasmáticos en sementales. Los ritmos circadianos han sido demostrados con posterioridad, en distintas especies y en gran cantidad de hormonas. El tiempo de aparición de las concentraciones máximas y mínimas varían dependiendo de la hormona que estemos estudiando y del tipo de actividad de la especie que estudiemos, así, por ejemplo, la concentración de testosterona es máxima en el hombre a primeras horas de la mañana (Alford *et al.*, 1973) y en los gerbillos lo es a primeras horas de la noche (Portela *et al.*, 1995). En el caballo, las concentraciones de testosterona varían a lo largo del día, siendo menores por la mañana temprano y aumentando sus concentraciones por la tarde (Nett, 1993c).

Los niveles de testosterona de las muestras recogidas a lo largo del día y correspondientes a los días cortos (noviembre) en el semental de Pura Raza Española, aparece representado en la Gráfica 7, observando un pico máximo de testosterona ($2,10 \pm 0,36$ ng/ml) hacia las dos de la tarde y un segundo pico hacia las once de la noche, con una concentración de $1,47 \pm 0,11$ ng/ml. Asimismo, se observan dos nadires a lo largo del día, el primero lo encontramos a las ocho de la tarde con un valor de $0,97 \pm 0,10$ ng/ml y el segundo mínimo ($0,88 \pm 0,10$ ng/ml), se produce a las ocho de la mañana. Se observa un aumento paulatino desde la toma de la primera muestra, a las ocho de la mañana, alcanzando niveles máximos entre las dos y las cinco de la tarde. En el momento en que comienza el anochecer, alrededor de las seis de la tarde, se observa una disminución de las concentraciones hasta llegar a las ocho de la noche momento en el cual comienza un segundo ascenso que culmina a las once de la noche, para volver a disminuir y mantenerse en niveles bajos durante la noche hasta el amanecer, alrededor de las ocho, donde comienza de nuevo el ciclo.

Un análisis de varianza de las muestras obtenidas mostraron unas diferencias significativas ($p < 0,05$) en las concentraciones de testosterona a lo largo del día, demostrando la existencia de un patrón circadiano en la secreción de testosterona

plasmática durante los días cortos, en el caballo de Pura Raza Española.

En cuanto al rango de concentraciones de testosterona ($0,88 \pm 0,10$ - $2,10 \pm 0,36$ ng/ml) en los sementales de Pura Raza Española, están dentro del margen descrito por algunos autores en distintas razas equinas (Kirkpatrick *et al.*, 1976; Ganjam y Kenney, 1975; Sharma *et al.*, 1976; Bono *et al.*, 1982 y Byers *et al.*, 1983).

Al igual que Byers *et al.* (1983), en su estudio realizado en caballos de distintas razas, podemos hablar de la naturaleza bifásica de la testosterona a lo largo del día, ya que este autor también observó la existencia de dos picos en la secreción de esta hormona, el primero entre las dos y las cinco de la tarde y el segundo entre las diez de la noche y la una de la madrugada. El estudio de los datos correspondientes a las muestras tomadas en nuestros caballos en los días cortos, demuestran la existencia de un patrón circasemidiano (aproximadamente doce horas) en la secreción de testosterona, estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

Las concentraciones de testosterona son mayores en el primer patrón circasemidiano por la presencia de las yeguas, ya que en nuestro estudio, estas salían de los boxes por la mañana y volvían a ellos al atardecer. Este hecho también lo confirmaron Bono *et al.* (1982) quienes observaron concentraciones máximas de testosterona entre las 12 de la mañana y las dos de la tarde, de 2 a 4 horas después de la exposición del semental a la hembra.

La secreción bifásica de la testosterona se observó también en el estradiol procedente de las muestras recogidas a lo largo de los días cortos (noviembre) en el caballo de Pura Raza Española, aunque el análisis estadístico no resultó significativo. Asimismo, el estudio realizado descarta la existencia de un patrón circadiano en la secreción de 17β -estradiol (Gráfica 8), obteniendo una significación de $p > 0,05$.

Nuestra primera muestra se tomó a las 8 de la mañana, y la aparición de las concentraciones mínimas fue a las 11, tres horas después ($31,60 \pm 3,07$ pg/ml), y la concentración máxima se obtuvo a las 2 de la mañana, con un nivel de $47,52 \pm 7,40$ pg/ml.

En la bibliografía consultada existen pocas referencias que confirmen la existencia de un patrón circadiano en las concentraciones de 17 β -estradiol. Al igual que en nuestro estudio, Bono *et al.* (1982) observaron que la concentración de estrógenos no variaba a lo largo del día, pero sí aumentaba durante la época de la monta y por la exposición del semental a la yegua en celo.

Por el contrario, sí hay gran cantidad de estudios relativos a las variaciones circadianas de cortisol, en distintas especies (Kumar *et al.*, 1976; Larsson *et al.*, 1979; Glardon y Schatzmann, 1982, Irvine y Alexander, 1994 y Levine *et al.*, 1994). Las concentraciones obtenidas para la hormona cortisol en el mes de noviembre (días cortos) en los caballos de Pura Raza Española mostraron variaciones significativas ($p < 0,05$) a lo largo del día, que confirman la existencia de un patrón circadiano en la secreción de cortisol, según aparece en la Gráfica 9.

Nuestro valor máximo se observó, coincidiendo con la mayoría de los autores consultados, a las ocho la mañana con una concentración media de $129,76 \pm 10,75$ ng/ml. El nadir se producía a las ocho de la tarde, con un valor de $58,95 \pm 7,29$ ng/ml. A partir de este momento comenzaba el ascenso para volver a obtener la concentración máxima a las ocho de la mañana ($167,78 \pm 18,75$ ng/ml).

El patrón circadiano del cortisol obtenido en sementales de Pura Raza Española, coincide con los encontrados por Glardon y Schatzmann (1982) en caballos de distintas razas, Toutain *et al.* (1983) e Irvine y Alexander (1994). Estos últimos demostraron que el ritmo circadiano del cortisol se produce en el caballo incluso en ausencia de cualquier factor, como por ejemplo el manejo. Larsson *et al.* (1979) utilizaron caballos castrados y obtuvieron las concentraciones máximas a las 6 de la mañana y las mínimas a las 6 de la tarde; es decir, al igual que nosotros con un intervalo de 12 horas entre la aparición del máximo y el mínimo.

En cuanto al margen en las concentraciones, James *et al.* (1970) y Lidner *et al.* (1990) obtuvieron niveles semejantes a los nuestros; sin embargo, Larsson *et al.* (1979),

Glardon y Schatzmann (1982), Toutain *et al.* (1988) y Sojka *et al.* (1993) obtenían valores inferiores, lo que pudiera explicarse debido a posibles diferencias entre razas, en cuanto a sus concentraciones.

Tras demostrar la existencia de patrones circadianos, para las tres hormonas, durante los días cortos y puesto que habíamos encontrado grandes diferencias en la secreción de las mismas a lo largo del año, decidimos estudiar si estos patrones variaban en los días largos, por lo que realizamos el mismo tipo de extracción en el mes de junio.

Al analizar estadísticamente las concentraciones de testosterona en el mes de junio a lo largo del día (Gráfica 10) las diferencias que encontramos no eran significativas ($p > 0,05$). El patrón que seguía la testosterona durante el día largo era muy semejante al obtenido en los días cortos con máximos a las cinco de la tarde y mínimos a las ocho de la noche, coincidentes con los obtenidos en los días cortos (Gráfica 13), si bien las concentraciones eran mayores. Este aumento en la concentración coincide con el ritmo circanual de la testosterona. Durante el mes de junio, aumenta el número de horas de luz y aparecen un mayor número de hembras en celo y según Bono *et al.* (1982), este último hecho contribuye al aumento en las concentraciones de esta hormona. Rabb *et al.* (1989), observaron un incremento en la concentración de testosterona a lo largo de la mañana, apareciendo un pico a mediodía, de dos a cuatro horas de duración, en la época reproductora (abril-junio).

El ritmo circadiano de la testosterona plasmática en caballos, en los días largos, fue demostrado por Thompson *et al.* (1985), observando una concentración máxima de $2,0 \pm 0,3$ ng/ml, muy semejante a la nuestra.

Asimismo, comprobamos lo que ocurría en el mes de junio con el 17β -estradiol (Gráfica 11), observando que la curva era también muy semejante a la obtenida en los días cortos, aunque estas variaciones tampoco eran estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Al comparar las concentraciones de estradiol en el mes de junio, con las obtenidas en el mes de noviembre obteníamos valores mayores, al igual que ocurría en el caso de la

testosterona, también relacionados con el aumento producido en el mes de junio en el patrón circanual.

Las variaciones en la concentración de cortisol durante los días largos (junio) aparecen reflejadas en la Gráfica 12, siendo estas variaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$), confirmando la existencia de un patrón circadiano del cortisol en días largos.

La concentración máxima se obtuvo a las ocho de la mañana, con un valor de $140,22 \pm 24,58$ ng/ml y la mínima a las once de la noche, tres horas más tarde que en el mes de noviembre, con una concentración de $66,73 \pm 12,71$ ng/ml. A continuación comenzaba el ascenso para volver a alcanzar valores máximos a las ocho de la mañana del día siguiente, con un valor de $149,76 \pm 27,85$ ng/ml.

Estos valores son muy superiores a los obtenidos por Kumar *et al.* (1976) al utilizar ponies sometidos a un régimen de 12 horas de luz, observando concentraciones máximas ($31,74 \pm 6,7$ ng/ml), entre las 9 y 11 de la mañana y de $19,61 \pm 3,16$ ng/ml entre las 6 de la tarde y las nueve de la noche

A diferencia de la testosterona y el 17β -estradiol, no encontramos diferencias en cuanto a las concentraciones de los días largos y cortos. Debemos tener en cuenta que el patrón circanual de la testosterona y el estradiol es totalmente distinto al patrón circanual del cortisol. Como se puede observar en la Gráfica 3, el cortisol sigue, además, un patrón bimensual a lo largo del año. Nuestra recogida de muestras para comparar días largos con días cortos ha coincidido con algunos de los meses de mayor concentración. Por lo que debemos hacer hincapié en la importancia que tiene la toma de muestras en estudios relacionados con variaciones en el tiempo. Si hubiéramos recogido cuatro muestras coincidiendo con las estaciones, no hubiésemos encontrado esta variaciones bimensuales.

El análisis estadístico realizado para obtener las posibles diferencias entre las concentraciones obtenidas en los días largos y cortos, resultó significativo ($p < 0,05$) tanto para la testosterona, como para el 17β -estradiol. No aparecieron diferencias significativas

en el caso del cortisol, ya que los dos patrones son prácticamente iguales (Gráfica 16). Debemos tener muy presente que estas diferencias, en el caso de la testosterona, se deben a variaciones en las concentraciones y no a variaciones en el patrón como puede observarse en las gráficas 13 .

CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos en el estudio realizado en los sementales de Pura Raza Española, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1ª CONCLUSION: La concentración plasmática de testosterona, 17 β -estradiol y cortisol, en el semental de Pura Raza Española, presenta un patrón circanual demostrado estadísticamente.

En el caso de la testosterona y el 17 β -estradiol, las concentraciones máximas se obtienen en los meses de primavera y verano, coincidiendo con la época reproductora, mientras que el cortisol presenta niveles máximos en invierno, observándose asimismo, un patrón bimensual.

2ª CONCLUSION: La presencia de un patrón circaseptano, estadísticamente significativo ($p < 0,05$), en la secreción de las hormonas testosterona, 17 β -estradiol y cortisol, en el semental de Pura Raza Española.

3ª CONCLUSION: La existencia de un patrón circadiano en las concentraciones de testosterona y cortisol en los días cortos (noviembre) y un patrón circadiano del cortisol en los días largos (junio), en sementales de Pura Raza Española.

4ª CONCLUSION: Tanto la secreción de la hormona testosterona, como del 17 β -estradiol, presentan variaciones circasemidianas; es decir, de aproximadamente 12 horas.

5ª CONCLUSION: Existe una gran semejanza entre los patrones circanuales de la testosterona y del 17 β -estradiol, ya que presentan una correlación altamente significativa ($r = + 90$, $p < 0,001$).

6ª CONCLUSION: Las concentraciones de testosterona y 17β -estradiol, durante los días largos y cortos, son estadísticamente diferentes, siendo mayores en los días largos (coincidiendo con una mayor actividad reproductora).

CONCLUSION FINAL: La existencia de ritmicidad en las secreciones de testosterona y cortisol a lo largo del año, semana y día, en los sementales de Pura Raza Española, mientras que en el 17β -estradiol, sólo se demuestra un patrón circanual y circaseptano, hechos que debemos recordar, a la hora de planificar la reproducción en esta raza de caballos.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio ha sido determinar los posibles ritmos biológicos de las hormonas testosterona, 17β -estradiol y cortisol, en los sementales de Pura Raza Española y su influencia sobre la reproducción.

Para la determinación de las variaciones circanuales, se recogieron, durante un año, muestras de sangre procedente de la vena yugular, siempre el mismo día de la semana y a la misma hora. Asimismo, se tomaron muestras durante siete días, siempre a la misma hora, para la determinación del posible patrón circaseptano. Para demostrar la existencia de un patrón circadiano, en dos épocas del año, noviembre (días cortos) y junio (días largos), se recogieron muestras de sangre cada tres horas, durante un total de 27 horas (comenzando a las 8:00 a.m.).

La determinación de las concentraciones plasmáticas de cada una de las hormonas estudiadas, se llevó a cabo mediante EIA de competición en microplaca de poliestireno.

El estudio estadístico, de las concentraciones hormonales, se realizó mediante el análisis de la varianza y covarianza con medidas repetidas, el test de comparación múltiple de Bonferroni y el test no paramétrico de Friedman, para estudiar la distribución de las variables estadísticas y un test de diferencia de media, para comprobar si las distintas variables poseían diferencias estadísticamente significativas. Los resultados muestran la existencia de distintos patrones en la secreción de testosterona, 17β -estradiol y cortisol.

En la testosterona, pudimos observar la presencia de un patrón circanual con concentraciones más elevadas durante los meses de mayo a septiembre, encontrándose la concentración máxima en el mes de julio. El 17β -estradiol muestra un patrón circanual, muy semejante al encontrado en la testosterona, con mayores concentraciones en los meses de junio y agosto, apareciendo el pico también en el mes de julio. El cortisol presenta un patrón circanual, totalmente distinto al de las otras dos hormonas, apareciendo niveles máximos en invierno (febrero), observándose también un patrón bimensual. Los picos correspondieron a los meses de febrero, abril, junio, agosto, octubre y diciembre. Los tres patrones fueron demostrados estadísticamente, todos con un valor de $p < 0,05$.

Se observaron las posibles correlaciones hormonales, resultando altamente significativas en el caso de la testosterona y el 17 β -estradiol ($r = + 90$, $p < 0,001$).

El análisis estadístico de las concentraciones hormonales a lo largo de la semana, demuestra un patrón circaseptano, para las tres hormonas. La testosterona muestra niveles máximos a principios de semana y mínimos a finales de la misma, mientras que el 17 β -estradiol presenta unos niveles mínimos a mediados de semana, manteniéndose más o menos constante los demás días. En el cortisol se observan las concentraciones máximas los martes, al igual que la testosterona, permaneciendo los niveles elevados y descendiendo a finales de la semana.

Los patrones circadianos de la testosterona y el cortisol, en el semental de Pura Raza Española, se demostraron de forma estadística ($p < 0,05$), durante el mes de noviembre (días cortos). En el caso de la testosterona, se observan concentraciones máximas por la mañana. Observamos, además, un patrón circasemidiano ($p < 0,05$), de aproximadamente doce horas, con concentraciones máximas a las cinco de la tarde y a las once de la noche. El 17 β -estradiol no presenta un patrón circadiano. El patrón circadiano del cortisol presenta las concentraciones máximas a primera hora de la mañana (8:00 a.m), para disminuir a lo largo del día y volver a ascender durante las horas de oscuridad. Cuando se analizaron las muestras recogidas durante el mes de junio (días largos), se observaron las mismas variaciones circadianas, para la testosterona, que en noviembre (días cortos), aunque sólo han podido ser demostradas de forma estadística en el caso del cortisol.

Las concentraciones de testosterona y 17 β -estradiol durante los días largos y cortos resultaron, estadísticamente diferentes, siendo mayores las de los días largos en las dos hormonas.

De todo ello podemos concluir, que existe una ritmicidad en las secreciones plasmáticas de testosterona y cortisol, en el semental de Pura Raza Española, con patrones circanuales, circaseptanos y circadianos; además de circasemidianos en la testosterona; si bien sólo se observó un patrón circanual y circaseptano en el 17 β -estradiol.

BIBLIOGRAFIA

ABRAHAM, G.E.- Solid phase radioimmunoassay of estradiol-17 β .

J. Clin. Biochem. **29**: 866-870, 1969.

ABRAHAM, G.E.- Radioimmunoassay of steroids in biological fluids.

J. Steroid. Biochem. **6**: 261-270, 1975.

ALBERT, D.H., M. ASCOLI, D. PUETT y J.G. CONIGLIO.- Lipid composition and gonadotropin-mediated lipid metabolism of the M5480 murine Leydig cell tumor.

J. Lipid Res. **21**: 862-865, 1980.

ALEXANDER, S.L., C.H.G. IRVINE, M.J. ELLIS y R.A. DONALD.- The effect of acute exercise on the secretion of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse.

Endocrinology. **128**: 65-72, 1991.

ALFORD, F.P., H.W.G. BAKER, Y.C. PATEL, G.C. RENNIE, G. YOUATT, H.G. BURGER y B. HUDSON. Temporal patterns of circulating hormones as assessed by continuous blood sampling.

Endocrinology. **36**: 108-116, 1973.

ALMAHBOBI, G., V. PAPADOPOULUS, S. CARREAU y P. SILVERZAHN.- Age-related morphological and functional changes in the Leydig cells of the horse.

Biol. Reprod. **383**: 653-665, 1988.

ALMAHBOBI, G., L.J. WILLIAMS, X.G. HAN y P.F. HALL.- Lipid droplets and mitochondria are bound to intermediate filaments in Leydig cells.

J. Reprod. Fert. **98**: 209-217, 1993.

AMANN, R.P. y V.K. GANJAM.- Effects of hemicastration or hCG-treatment on steroids in testicular vein and jugular vein blood of stallions.

J. Androl. **2**: 132-139, 1981.

- AMANN, R.P.- Functional anatomy of the adult male. En: Equine Reproduction, editado por A.O. Mckinnon y J.L. Voss. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993a, p: 645-657.
- AMANN, R.P.- Physiology and Endocrinology. En: Equine Reproduction, editado por A.O. Mckinnon y J.L. Voss. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993b, p: 658-685.
- AMIRAT, Z. y BRUDIEUX, R.- Seasonal changes in *in vivo* cortisol response to ACTH and in plasma and pituitary concentrations of ACTH in a desert rodent the sand rat (*Psammomys obesus*).
Comp. Biochem. Physiol. (A). **104**: 29-34, 1993.
- ANDERSON, C.M. y C.R. MENDELSON.- Regulation of steroidogenesis in rat Leydig cells in culture.
Biochem. Biophys. **238**: 378-387, 1985.
- ARGO, C.M., J.E. COX y J.L. GRAY.- Effect of oral melatonin treatment on the seasonal physiology of pony stallions.
J. Reprod. Fert. Suppl. **44**: 115-125, 1991.
- ASCHOFF, J. y H. POHL.- Phase relations between a circadian rhythm and its Zeitgeber within the range of entrainment.
Naturwissenschaften. **65**: 80-84, 1978.
- BAKER, H.W., I.D. BAKER, V.M. EPSTEIN y B. HUDSON.- Effect of stress on steroid hormone levels in racehorses.
Aust. Vet. J. **58**: 70-71, 1982.
- BARTKE, A., R.E. STEELE, N. MUSTO y B.V. CALDWELL.- Fluctuations in plasma testosterone levels in adult male rats and mice.
Endocrinology. **92**: 1223-1227, 1973.

BEDRAK, E. y L.T. SAMUELS.- Steroid biosynthesis by equine testis.

Endocrinology. **85**: 1186-1195, 1969.

BERNDTSON, W.E., B.W. PICKETT y T.M. NETT.- Reproductive physiology of the stallion. IV. Seasonal changes in the testosterone concentration of peripheral plasma.

J. Reprod. Fert. **39**: 115-118, 1974.

BERNDTSON, W.E., E.L. SQUIRES y D.L. THOMPSON.- Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season.

Theriogenology. **20**: 449-457, 1983.

BERNDTSON, W.E. y L.S. JONES.- Relationship of intratesticular testosterone content of stallions to age, spermatogenesis, Sertoli cell distribution and germ cell-Sertoli cell ratios.

J. Reprod. Fert. **85**: 511-518, 1989.

BERNE, R. y M. LEVY.- Fisiología. 1ª ed., editado por Mosby-Year Book de España. 1992, p:558-598.

BLUE, B.J., B.W. PICKETT, E.L. SQUIRES, A.O. McKINNON, T.M. NETT, R.P. AMANN y K.A. SHINER.- Effect of pulsatile or continuous administration of GnRH on reproductive function of stallions.

J. Reprod. Fert. Suppl. **44**: 145-154, 1991.

BONO, G., D. MINORI, R. GAIANI y M. MATTIOLI.- Concentrations of oestrone sulphate, androgens and LH in peripheral plasma of mating stallions.

J. Reprod. Fert. **66**: 17-22, 1982.

- BORG, K.E., K.L. ESBENSHADE, B.H. JOHNSON, D.D. LUNSTRA y J.J. FORD.-
Effects of sexual experience, season, and mating stimuli on endocrine concentrations in the adult ram.
Horm. Behav. **26**: 87-109, 1992.
- BOSSUT, D.F., L.S. LESHIN, M.W. STROMBERG y P.V. MALVEN.- Plasma cortisol and beta-endorphin in horses subjected to electro-acupuncture for cutaneous analgesia.
Peptides. **4**: 501-507, 1983.
- BOTTOMS, G.D., O.F. ROESEL, F.D. RAUSCH y A.L. AKINS.- Circadian variation in plasma cortisol and corticosterone in pigs and mares.
Am. J. Vet. Res. **33**: 785-790, 1972.
- BYERS, S.W., F.J. DOWSETT y T.D. GLOVER.- Seasonal and circadian changes of testosterone levels in the peripheral blood plasma of stallions and their relation to semen quality.
J. Endocrinol. **99**: 141-150, 1983.
- CAMERON, E.H.D. y J.K. GRANT.- Biochemistry of histologically defined zones in the adrenal cortex: cortisol synthesis in the horse.
J. Endocrinol. **37**: 413-420, 1967.
- CARRUTHERS, T.D.- Principles of hormone therapy in Theriogenology. En: Current therapy in Theriogenology 2. Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals, editado por D.A. Morrow. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986, p:3-13.

- CHANDERBAHN, R., B.J. NOLAND, T.J. SCALLEN y G.V. VAHOUNY.- Sterol carrier protein 2: Delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis.
J. Biol. Chem. **257**: 8028-8935, 1982.
- CHRISTENSEN, A.K. y N.R. MANSON.- Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testes to synthesize androgens from progesterone-4-¹⁴C *in vitro*.
Endocrinology. **76**: 646-650, 1965.
- CLAY, CM., F.L. SQUIRES, R.P. AMANN y B.W. PICKETT.- Influences of season and artificial photoperiod on stallions: testicular size, seminal characteristics and sexual behavior.
J. Anim. Sci. **64**: 517-525, 1987.
- CLAY, C.M., F.L. SQUIRES, R.P. AMANN y T.M. NETT.- Influences of season and artificial photoperiod on stallions: Luteinizing hormone follicle stimulating hormone and testosterone.
J. Anim. Sci. **66**: 1246-1255, 1988.
- CLAY, C.M., F.L. SQUIRES, R.P. AMANN y T.M. NETT.- Influences of season and artificial photoperiod on stallions: pituitary and testicular responses to exogenous GnRH.
J. Anim. Sci. **67**: 763-770, 1989.
- CLAY, C.M. y J.N. CLAY.- Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod, and the peri-pubertal period in stallions.
Vet. Clin. North Am. Equine Pract. **8**: 31-56, 1992.

CLEVA, G.M., G.M. STONE y R.K. DICKENS.- Variation in reproductive parameters in the captive male koala (*Phascolarctos cinerus*).
Reprod. Fert. Develop. **6**: 713-719, 1994.

COLBORN, D.R., D.L. THOMPSON JR., M.S. RAHMANIAN y T.L. ROTH.- Plasma concentrations of cortisol, prolactin, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in stallion after physical exercise and injection of secretagogue before and after sulpiride treatment in winter.
J. Anim. Sci. **69**: 3724-3732, 1991a.

COLBORN, D.R., D.L. THOMPSON JR., T.L. ROTH, J.S. CAPEHART y K.L. WHITE.- Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings.
J. Anim. Sci. **69**: 2556-2562, 1991b.

CORNÉLISSEN, G. y F. HALBERG. Introduction to chronobiology. Variability: from foe to friend, of mice and men. Medtronic Chronobiology Seminar, editado por Halberg. Minneapolis: Medtronic, 1994, p: 1-51.

COX, J.E., J.H. WILLIAMS, P.H. ROWE y J.A. SMITH.- Testosterone in normal, cryptorchid and castrated male horses.
Equine Vet. J. **5**: 85-90, 1973.

COX, J.E.- Experiences with a diagnostic test for equine cryptorchidism.
Equine Vet. J. **7**: 179-183, 1975.

COX, J.E. y J.H. WILLIAMS.- Some aspect of the reproductive endocrinology of the stallion and cryptorchid.
J. Reprod. Fert. Suppl. **23**: 75-79, 1975.

COX, J.E., P.H. REDHEAD y F.E. DAWSON.- Comparison of the measurement of plasma testosterone and plasma oestrogens for the diagnosis of cryptorchidism in the horse.

Equine Vet. J. **18**: 179-182, 1986.

COX, J.E., P.H. REDHEAD y N.M.A. JAWAD.- The effect of artificial photoperiod at the end of the breeding season on plasma testosterone concentration in stallions.

Austr. Vet. J. **65**: 239-241, 1988.

DADOUNE, J.P. y A. DEMOULIN.- Structure and functions of the testis. En: Reproduction in Mammals and Man, editado por C. Thibault, M.C. Levasseur y R.H.F. Hunter. París: Elipses, 1993, p:228-255.

DALLE, M., A. ELHAMI y P. DELOST.- Changes in cortisol binding and metabolism during neonatal development in the guinea pig.

J. Endocrinol. **85**: 219-225, 1980.

DIERSCHKE, D.J., A.N. BATTACHARYA, L.E. ATKINSON y E. KNOBIL.- Circadian oscillation of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey.

Endocrinology. **87**: 850-854, 1970.

DIXON, W.J.- BMDP statistical software manual. Rel. 7. Los Angeles: University of California Press, 1992.

DOUGLAS, R.H. y N. UMPHENOUR.- Endocrine abnormalities and hormonal therapy.

Vet. Clinic. North Am. Equine Pract. **8**: 237-249, 1992.

EIK-NES, K.B., P.F. HALL.- Secretion of steroid hormones in vivo.

Vit. Horm. **23**: 153-181, 1965.

- EILER, H., D. GOBLE y J. OLIVER.- Adrenal gland function in the horse: effects of cosyntropin (synthetic) and corticotropin (natural) stimulation.
Am. J. Vet. Res. **40**: 724-726, 1979.
- EVANS, J.W., C.M. WINGET y E.J. POLLAK.- Rhythmic cortisol secretion in the equine: analysis and physiological mechanisms.
J. Interdiscipl. Cycle Res. **8**: 111-121, 1977.
- EWING, L. y B.L. BROWN.- Testicular steroidogenesis. En *The testis*. Vol. 4, editado por A.D. Johnson y W.R. Gomes. New York: Academy Press, 1977, p: 239-287.
- FLISINSKA-BOJANOWSKA, A., K. SKWARLO, J. LUKASZEWSKA, D. BOBILEWICZ, M. WILK y J. GILL.- Diurnal variations of serum cortisol and PBI in the Thoroughbred horse and effect of physical effort on plasma cortisol concentration.
Bull. Acad. Pol. Sci. **22**: 10-18, 1974.
- FLISINSKA-BOJANOWSKA, A., M. KOMOSA y J. GILL.- Influence of pregnancy on diurnal and seasonal changes in cortisol, T3 and T4 levels in the mare blood serum.
Comp. Biochem. Phys. (A). **98**: 23-30, 1991.
- FLORIS, B., P.P. BINI y P. NUVOLE.- Andamento stagionale del testosterone ematico nel cavallino della Giara.
Boll. Soc. It. Biol. Sper. **65**: 735-741, 1989.
- FUJIEDA, K., A.K. GOFF, M. PUGEAT y C.A. STROTT.- Regulation of the pituitary-adrenal axis and corticosteroid-binding globulin-cortisol interaction in the guinea pig.
Endocrinology. **111**: 1944-1950, 1982.

- FULKERSON, W.J. y B.Y. TANG.- Ultradian and circadian rhythm in the plasma concentrations of cortisol in sheep.
J. Endocrinol. **81**: 135-151, 1979.
- GAILLARD, J.L. y P. SILBERZAHN.- Aromatization of 19-Norandrogens by equine testicular microsomes.
J. Biol. Chem. **262**: 5717-5722, 1987.
- GAILLARD, J.L.- Equine testicular aromatase: substrates specificity and kinetic characteristics.
Comp. Biochem. Physiol. (B). **100**: 107-115, 1991.
- GÄNGEL, H., F. GÖTZ y F. STAHL.- Plasmatestosteronwerte bei wallachen, hengsten und kryptorchen hengsten: Bedeutung der hormonbestimmung für die diagnostik des kryptorchen henstes.
Mh. Vet. Med. **42**: 87-88, 1987.
- GANJAM, V.K. y R.M. KENNEY.- Androgens and oestrogens in normal and cryptorchid stallions.
J. Reprod. Fert. Suppl. **23**: 67-73, 1975.
- GANJAM, V.K.- Episodic nature of the $\Delta 4$ -ene and $\Delta 5$ -ene steroidogenic pathways and their relationship to the adreno-gonadal axis in stallions.
J. Reprod. Fert. Suppl. **27**: 67-71, 1979.
- GARCIA, M.C., V.K. GANJAM, T.L. BLANCHARD, E. BROWN, K. HARDIN, R.G. ELMORE, R.S. YOUNGQUIST, W.E. LOCH, M.R. ELLERSIECK y J.M. BALKE.- The effect of stanozolol and boldenone undecylenate on plasma testosterone and gonadotropins and on testis histology in pony stallions.
Theriogenology. **28**: 109-119, 1987.

- GARNIER, D.H., R. ORTAVANT, F.X. MANSARD y M. TERQUI.- Influence de la lumière sur les variations de la testostéronémie chez le Belier: mise en évidence d'une phase photosensible au cours du rythme diurne.
C.R. Acad. Sc. Paris. **284**: 61-64, 1977.
- GARRIS, D.R.- The ovarian-adrenal axis in the guinea pig: effects of photoperiod, cyclic state and ovarian steroids on serum cortisol levels.
Horm. Metabol. Res. **18**: 34-37, 1986.
- GLARDON, O. y U. SCHATZMANN.- Effect of ACTH on plasma cortisol levels and hematological parameters in the horse.
Schweiz. Arch. Tierheilk. **124**: 435-445, 1982.
- GORE-LAUGHTON, R.E. y D.T. ARMSTRONG.- Follicular steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction*, editado por E. Knobil y J. Neill *et al.*. New York: Raven Press Ltd, 1988, p:331-385.
- GUTHRIE, G.P. Jr., S.G. CECIL y T.A. KOTCHEN.- Renin, aldosterone and cortisol in the Thoroughbred horse.
J. Endocrinol. **85**: 49-53, 1980.
- HALBERG, F y M.B. VISSCHER.- Regular diurnal physiological variation in eosinophil levels in five stocks of mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) **75**: 846-847, 1950.
- HALBERG, F., M.B. VISSCHER y J.J. BITTNER.- Relation of visual factors to eosinophil rhythm in mice.
Am. J. Physiol. **179**: 229-235, 1954.

HALBERG, F.- Physiologic 24-hour periodicity: general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle.

Z. Vitamin. Hormon.- u. Fermentforsch. **10**: 225-296, 1959.

HALBERG, F.- Circadian (about 24 hours) rhythms in experimental medicine.

Proc. Roy. Soc. Med. **56**: 253-257, 1963.

HALBERG, F.- Chronobiology.

Ann. Rev. Physiol. **31**: 675-725, 1969.

HALBERG, F.- Body temperature, circadian rhythms and the eye. En: *Photorègulation de la Reproduction chez les Oiseaux et les Mammifères*, editado por J. Benoit y I. Assenmacher. París: Centre National de la Reserche Scientifique No 172, 1970a, p:497-528.

HALBERG, F.- Chronobiology and delivery of health care. En: *A System Approach to the Application of Chronobiology in Family Practice*, editado por J. O'Leary. Minesota: Health Care Research Program, Department of Family Practice and Community Health, University of Minnesota, 1970b, p:31-96.

HALL, P.F y M. NAKAMURA.- The influence of adrenocorticotropin on transport of a cholesteryl linoleate-low density lipoprotein complex into adrenal tumor cells.

J. Biol. Chem. **254**: 12547-12554, 1979.

HALL, P.F.- Testicular steroid synthesis. Organization and Regulation. En: *The Physiology of Reproduction*, editado por E. Knobil y J. Neil *et al.*. New York: Raven Press Ltd., 1988, p:975-998.

HALL, P.F.- Molecular Biology of Testicular Steroid Secretion. En: *Molecular Biology of the Male Reproductive System*, editado por D. de Kretser. San Diego: Academic Press, Inc., 1993, p: 328-370.

- HAMBLEN-COYLE, M., W.A. ZEHRING, C.P. KYRIACOU, P. REDDY, Q. YU, D.A. WHEELER, L.J. ZWIEBEL, R.J. KONOPKA, M. ROSBASH y J.C. HALL.- Germ-line transformation involving DNA from the period locus in *Drosophila melanogaster*. Overlapping genomic fragments that restore circadian and ultradian rhythmicity to *per*⁰ and *per*-mutans.
J. Neurogenet. **3**: 249-291, 1986.
- HARDIN, P.E., J.C. HALL y M. ROSBASH.- Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA.
Nature. **343**: 536-540, 1990.
- HARRIS, J.M., C.H.G. IRVINE y M.J. EVANS.- Seasonal changes in serum levels of FSH, LH, and testosterone and in semen parameters in stallions.
Theriogenology. **19**: 311-322, 1983.
- HOFFSIS, G.F., P.W. MURDICK, V.L. THARP y K. AULT.- Plasma concentrations of cortisol and corticosterone in the normal horse.
Am. J. Vet. Res. **31**: 1379-1387, 1970.
- HOUGHTON, E., M.C. DUMASIA, P. TEALE, S.J. SMITH, J. COX, D. MARSHALL y D.B. GOWER.- The use of stable isotopes and gas chromatography/mass spectrometry in the identification of steroid metabolites in the equine.
Steroids. **55**: 433-439, 1990.
- ILLERA, J.C., M.J. ILLERA, G. SILVAN y M. ILLERA.- Correlations between ultrasonography findings and hormonal profiles at oestrus in pure Spanish breed mares.
Austr. Vet. J. **70**: 273-275, 1993a.

- ILLERA, J.C., G. SILVAN, M.J. ILLERA y M. ILLERA.- Trends in Reproductive Endocrinology: Steroid hormone profiles in several domestic species and the Methodology for determination thereof. En: Trends in Comparative Biochemistry & Physiology. Council of Scientific Research Integration, Research Trends, Trivandrum, India, p: 869-879, 1993b.
- ILLERA, J.C., G. SILVAN, A. PORTELA, M.J. ILLERA, M. ILLERA, L. GARCIA ALONSO, G. CORNÉLISSEN y F. HALBERG.- Circadian cortisol rhythm of rabbits kept on different lighting regimens.
Chronobiologia. **20**: 219-232, 1993c.
- INOUE, J., W.A. CERBITO, N. OGURI, T. MATSUZAWA y K. SATO.- Serum levels of testosterone and oestrogens in normal and infertile stallions.
Int. J. Androl. **16**: 155-158, 1993.
- IRVINE, C.H.G., S.L. ALEXANDER y J.P. HUGHES.- Sexual behavior and serum concentrations of reproductive hormones in normal stallions.
Theriogenology. **23**: 607-617, 1985.
- IRVINE, C.H.G. y S.L. ALEXANDER.- Measurement of free cortisol and the capacity and association constant of cortisol-binding proteins in plasma of foals and adult horses.
J. Reprod. Fert. Suppl. **35**: 19-24, 1987.
- IRVINE, C.H.G. y S.L. ALEXANDER.- Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse.
Dom. Anim. Endocrinol. **11**: 227-238, 1994.
- JAMES, V.H.T., M.W. HORNER, M.S. MOSS y A.V. RIPPON.- Adrenal cortical function in the horse.
J. Endocrinol. **48**: 319-335, 1970.

JAMES, V.H.T.- The adrenal gland. New York: Raven Press, 1979.

JAMES, V.H.T. y FEW, J.D.- Adrenocorticosteroids: Chemistry, Synthesis and Disturbances in Disease.

Clin. Endocrinol. Metabol. **14**:867-892, 1985.

JEFFCOATE, W.J. y R.V. SHORT.- Hydrotestosterone in testicular tissue, and its androgenic potency in vivo.

J. Endocrinol. **48**: 199-204, 1970.

JOHNSON, L. y W.B. NEAVES.- Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallion.

Biol. Reprod. **24**: 703-712, 1981.

JOHNSON, L. y D.L. THOMPSON JR.- Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentration of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions.

Biol. Reprod. **29**: 777-789, 1983.

JOHNSON, L. y H.B. NGUYEN.- Annual cycle of Sertoli cell population in adult stallions.

J. Reprod. Fert. **76**: 311-316, 1986.

JOHNSON, L. y D.L. THOMPSON JR.- Seasonal variation in the total volumen of Leydig cells in stallions is explained by variation in cells number rather than cell size.

Biol. Reprod. **35**: 971-979, 1986.

JOHNSON, L. y D.L. THOMPSON JR.- Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smoothe endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions.

J. Reprod. Fert. **81**: 227-232, 1987.

JOHNSON, L. Y M.E. TATUM.- Temporal appearance of seasonal changes in numbers of Sertoli cells, Leydig cells, and germ cells in stallions.

Biol. Reprod. **40**: 994-999, 1989.

JOHNSON, L., D.D. VARNER y D.L. THOMPSON JR.- Effect of age and season on the establishment of spermatogenesis in the horse.

J. Reprod. Fert. Suppl. **44**: 87-97, 1991.

KEMPPAINEN, R.J. y J.L. SARTIN.- Evidence for episodic but no circadian activity in plasma concentration of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxin in dog.

J. Endocrinol. **103**: 219-226, 1984.

KIRKPATRICK, J.F., R. VAIL, S. DEVOUS, S. SCHWEND, C.B. BAKER y L. WIESNER.- Diurnal variation of plasma testosterone in wild stallion.

Biol. Reprod. **15**: 98-101, 1976.

KIRKPATRICK, J.F., L. WIESNER, C.B. BAKER y M. ANGLE.- Diurnal variation of plasma corticosteroids in the wild horse stallion.

Comp. Biochem. Physiol. (A). **57**: 179-181, 1977

KUMAR, M.S.A., T.F. LIAO y C.L. CHEN.- Diurnal variation in serum cortisol in ponies.

J. Anim. Sci., **42**: 1360, 1976.

LARSSON, M., L.E. EDQUIST, K. EKMAN y S. PERSSON.- Plasma cortisol in the horse, diurnal rhythm and effects of exogenous ACTH.

Acta Vet. Scand. **20**: 16-24, 1979.

- LEUNG, B.G. CORNELISSEN, D. HILLMAN, Z.R. WANG, S. BINKLEY, C. BINGHAM y F. HALBERG.- Halting steps toward a circadian - infradian pineal melatonin chronome. En: Proc. Workshop on Computer Methods on Chronobiology and Chronomedicine, editado por K. Otsuka, H. Watanaba, G. Cornélissen y F. Halberg. Tokio: Tokio Press, 1990.
- LEVINE, M.E., A.N. MILLIRON y L.K. DUFFY.- Diurnal and seasonal rhythms of melatonin, cortisol and testosterone in interior Alaska.
Arctic. Med. Res. **53**: 25-34, 1994.
- LINCON, G.A.- Seasonal variation in the episodic secretion of luteinizing hormone and testosterone in the ram.
J. Endocrinol. **69**: 213-226, 1976.
- LINDNER, A., Y. WILL y J. CHRISPEELS.- Referenzwerte für Cortisol, T₄ und T-Uptake bei verschiedene Pferdegruppen bestimmt mittels Fuloreszenz-Polarisation-Immunoassays (FPIA_s).
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **103**: 411-416, 1990.
- LOPEZ-CALDERON, A.- Glándulas suprarrenales. En: Fisiología Humana, editado por J.A.F. Tresguerres. Madrid: Interamericana McGraw-Hill, 1992, pp. 971-991.
- McDONNELL, M.S. y MURRAY, S.C.- Bachelor and harem stallion behavior and endocrinology.
Biol. Reprod. Mono. **1**: 577-590, 1995.
- MONFORT, S.L., J.L. BROWN y D.E. WILDT.- Episodic and seasonal rhythms of cortisol secretion in male Eld's deer (*Cervus eldi thamin*).
J. Endocrinol. **138**: 41-49, 1993.

- MUNRO, C. y STABENFELDT, G.- Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone.
J. Endocrinol. **101**: 41-49, 1984.
- NADEN, J., R.P. AMANN y E.L. SQUIRES.- Testicular growth-hormone concers seminal characteristics and sexual behavior in stallions.
J. Reprod. Fert. **88**: 167-176, 1990.
- NAKAJIN, S. y P.F. HALL.- Side-chain cleavage of C₂₁ steroids to C₁₉ steroids by testicular microsomal cytochrome P450: 17 α -hydroxy-C₂₁ steroids as obligatory intermediates.
J. Steroid Biochem. **14**: 1249-1255, 1981.
- NAKAJIN, S. y P.F. HALL.- Side-chain cleavage of C₂₁ steroids by testicular microsomal cytochrome P450 (17 α -hydroxylase/liase): Involvement of heme.
J. Steroid Biochem. **19**: 1345-1348, 1983.
- NELSON, W., L. SCHEUING y F. HALBERG.- Circadian rhythms in mice allowed simple daily meal at different stages of LD (12:12) lighting regimen.
J. Nutr. **105**: 151-184, 1975.
- NETT, T.M.- Estrogens. En: Equine Reproduction, editado por A.O. McKinnon y J.L. Voss. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993a, p. 65-68.
- NETT, T.M.- Adrenal steroids. En: Equine Reproduction, editado por A.O. McKinnon y J.L. Voss. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993b, p. 97-99
- NETT, T.M.- Reproductive endocrine function testing in stallions. En: Equine Reproduction, editado por A.O. McKinnon y J.L. Voss. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993c, p. 821-824.

- NISHIHARA, M., C.A. WINTERS, E. BUZKO, M.R. WATERMAN y M.L. DUFAU.-
Hormonal regulation of rat Leydig cell cytochrome P450 17α mRNA levels.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **154**: 151-158, 1988.
- NISWENDER, G.D.- Mechanisms of hormone action. En: *Equine Reproduction*, editado
por A.O. Mckinnon y J.L. Voss. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p: 27-36.
- NYMAN, M.A., J. GEIGER y J.W. GOLDZIEHER.- Biosynthesis of estrogen by the
perfused stallion testis.
J. Biol. Chem. **234**: 16-21, 1959.
- OH, R. y B. TAMAOKI.- Steroidogenesis in equine testis.
Acta Endocrinol. **64**: 1-16, 1970.
- ONODA, M. y P.F. HALL.- Inhibition of testicular microsomal cytochrome P450 (17-
hydroxylase-C_{17,20}-liase by estrogens.
Endocrinology **109**: 763-767, 1981.
- OSHIMA, H. y A.I. OCHI.- On testicular 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase: Product
activation.
Biochim. Biophys. Acta **306**: 227-235, 1973.
- OTTENWELLER, J.E., W.N. TAPP, D.L. PITMAN y B.H. NATELSON.- Adrenal,
thyroid, and testicular hormone rhythms in male golden hamsters on long and short
days.
Am. J. Physiol. **253**: 321-328, 1987.
- PICKETT, B.W., C. FAULKNER y J.L. VOSS.- Effect of season on some characteristics
of stallion semen.
J. Reprod. Fert. Suppl. **23**: 25-28, 1975.

- PICKETT, B.W., R.P. AMANN, A.O. MCKINNON, E.L. SQUIRES y J.L. VOSS.-
Management of the stallion for maximum reproductive efficiency. II.
Animal Reproduction Laboratory Bulletin No. 5. Fort Collins, Colorado State
University, 1989.
- PICKETT, B.W.- Sexual behaviour. En: *Equine Reproduction*, editado por A.O.
McKinnon, J.L. Voss. Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1993, p: 809-820.
- PICKETT, B.W.- The stallion: Retrospective analysis and opinions.
Biol. Reprod. Mono. 1: 547-564, 1995.
- PORTELA ARTEAGA, A.- Contribución al estudio de la Cronofisiología: Aspectos
experimentales. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, U.C.M.. 1993.
- PORTELA, A., J.C. ILLERA, G. SILVAN, P.L. LORENZO, P. MILLAN, A. BLASS,
M.M. MARTINEZ, M.J. ILLERA y M. ILLERA.- Ritmo circadiano de la
testosterona plasmática en gerbillos.
Rev. Exp. Anim. 6: 48, 1995.
- RABB, M.H., D.L. THOMPSON JR., B.E. BARRY, D.R. COLBORN, F. GARZA JR. y
K.E. HEHNKE.- Effects of sexual stimulation, with and without ejaculation on
serum concentrations of LH, FSH, testosterone, cortisol and prolactin in stallions.
J. Anim. Sci. 67: 2724-2729, 1989.
- RAESIDE, J.I.- Seasonal changes in the concentration of estrogens and testosterone in the
plasma of the stallion.
Anim. Reprod. Sci. 1: 205-212, 1978/79.

- REINBERG, A., M. LAGOGUEY, F. CESSÉLIN, Y. TOUITOU, J. LEGRAND, A. DELASALLE, J. ANTREASSIAN y A. LAGOGUEY.- Circadian and circannual rhythms in plasma hormones and other variables of five healthy young human males. *Acta Endocrinol.* **88**: 417-427, 1978.
- ROBEL, P.- Steroidogenesis: The enzymes and regulation of their genomic expression. En: *Reproduction in Mammals and Man*, editado por C. Thibault, M.C. Levasseur y R.H.F. Hunter. París: Elipses, 1993, p: 135-142.
- ROSER, J.F. y J.P. HUGHES.- Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations, and GnRH-induced LH response in fertile and subfertile stallions. *J. Androl.* **13**: 214-223, 1992a.
- ROSER, J.F. y J.P. HUGHES.- Dose-response effects of gonadotropin-releasing hormone on plasma concentrations of gonadotropins and testosterone in fertile and subfertile stallions. *J. Androl.* **13**: 543-550, 1992b.
- SAMUELS, L.T. y K. MATSUMOTO.- Localization of enzymes involved in testosterone biosynthesis in mouse testis. *Endocrinology.* **94**: 55-56, 1974.
- SAMUELS, L.T., L. BUSSMAN, K. MATSUMOTO y R.A. HUSEBY.- Organization of androgen biosynthesis in the testis. *J. Steroid Biochem.* **6**: 291, 1975.
- SANWAL, P.CH., A. SUNDBY y L-E. EDQUIST.- Diurnal variation of peripheral plasma level of testosterone in bulls measured by a rapid radioimmunoassay procedure. *Acta Vet. Scand.* **15**: 90-99, 1974.

SCHUURS, A.H.W.M. y B.K. VAN WEEMEN.- Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool.

J. Immunoassay. 1: 229-249, 1980.

SEAMANS, M.C., J.F. ROSER, R.L. LINFORD, I.K.M. LIU y J.P. HUGHES.- Gonadotrophin and steroid concentrations in jugular and testicular venous plasma in stallions before and after GnRH injection.

J. Reprod. Fert. Suppl. 44: 57-67, 1991.

SEREN, E. y A. VENTURINI.- Modificazioni ormonali e metaboliche indotte dall'allanamento nel cavallo trotatore.

La Nuova Veterinaria 6: 332-346, 1972.

SHARMA, O.P.- Diurnal variations of plasma testosterone in stallions.

Biol. Reprod. 15: 158-162, 1976.

SHARP, D.C., B.D. CLEAVER y S.D. DAVIS.- Photoperiod. En: *Equine Reproduction*, editado por A.O. McKinnon y J.L. Voss. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p: 179-185.

SHELDON, P.E. y C.J. COPPENGHER.- A rapid radioimmunoassay for serum testosterone.

Steroids. 30: 149-157, 1977.

SILBERZAHN, P., E.J.-M. POURET y I. ZWAIN.- Androgen and oestrogen response to a single injection of hCG in cryptorchid horses.

Equine Vet. J. 21: 126-129, 1989.

SILVAN, G., J.C. ILLERA, J. MARTIN, R. MANJON y M. ILLERA.- Variaciones fotoperiódicas de las concentraciones plasmáticas de testosterona en conejo.

Rev. Esp. Fisiol. 46: 177-182, 1990.

- SILVAN GRANADO, G.- Correlaciones entre tamaño folicular y niveles de hormonas esteroides en ganado vacuno. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. U.C.M. 1991.
- SILVAN, G. y J.C. ILLERA.- Bioquímica y fisiología de hormonas gonadales. En: Reproducción de los animales domésticos. Barcelona: Aedos, S.A. 1994, p:27-58.
- SNOW, D.H.- Anabolic steroids.
Vet. Clin. North Am. Equine Pract. **9**: 563-576, 1993.
- SOJKA, J.E., M.A. JOHNSON y G.A. BOTTOMS.- The effect of starting time on dexamethasone suppression as results in the horses.
Dom. Anim. Endocrinol. **10**: 1-5, 1993.
- SQUIRES, E.L.- Puberty. En: *Equine Reproduction*, editado por A.O. McKinnon y J.L. Voss. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p: 114-120.
- STABENFELDT, G.H. y J.P. HUGHES.- Diagnostic endocrinology of the horse.
Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract. **2**: 253-265, 1980.
- STULL, C.L. y A.V. RODIEK.- Responses of blood glucose, insulin and cortisol concentrations to common equine diets.
J. Nutr. **118**: 206-213, 1988.
- SUN CHOI, H.- Immunologische Bestimmung von Sexualsteroiden zur Fertilitätskontrolle bei Rind, Schwein und Pferd.
Wien. Tierärztl. Mschr. **74**: 14-22, 1987
- TAMANINI, C. N. GIORDANO, F. CHIESA y E. SEREN.- Plasma cortisol variations induced in the stallion by mating.
Acta Endocrinol. **102**: 447-450, 1983.

TAMAOKI, B.- Steroidogenesis and cell structure. Biochemical pursuit of sites of steroid biosynthesis.

J. Steroid Biochem. **4**: 89, 1973.

THIBIER, M.- Diurnal testosterone and 17 α -hydroxyprogesterone in peripheral plasma of young post-pubertal bulls.

Acta Endocrinol. **81**: 623-634, 1976.

THOMAS, J.L., E.A. BERKO, A. FAUSTINO, R.P. MYERS y R.C. STRICKLER.
Human placental 3 β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5-4-ene-isomerase.

J. Steroid Biochem. **31**: 785-793, 1988.

THOMPSON, D.L. Jr., B.W. PICKETT, W.E. BERNDTSON, J.L. VOSS y T.M. NETT.-
Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod collection interval and seminal characteristics, sexual behaviour and concentration of LH and testosterone in serum.

J. Anim. Sci. **44**: 656-664, 1977.

THOMPSON, D.L. Jr., B.W. PICKETT y T.M. NETT.- Effect of season and artificial photoperiod on levels of estradiol-17 β and estrone in blood serum of stallions.

J. Anim. Sci. **47**: 184-187, 1978.

THOMPSON, D.L. Jr., R.L. ST. GEORGE, L.S. JONES y F. GARZA JR.- Patterns of secretion of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone in stallions during the summer and winter.

J. Anim. Sci. **60**: 741-748, 1985.

- THUN, R., E. EGGENBERGER, K. ZEROBIN, T. LUSCHER y W. VETTER.- Twenty-four hour secretory pattern of cortisol in the bull: evidence of episodic secretion and circadian rhythm.
Endocrinol. **109**: 2208-2212, 1981.
- TOUTAIN, P.L., M. OUKESSOU, A. AUTEFAGE y M. ALVINERIE.- Diurnal and episodic variation of plasma hydrocortisone concentrations in horses.
Domest. Anim. Endocrinol., **5**: 55-59, 1988.
- UNGAR, F. y F. HALBERG.- *In vitro* explotation of a circadian rhythm in adrenocorticotropic activity of C mouse hipophysis.
Experientia. **19**: 158-159, 1963.
- VAN WEEMEN, B.K. y A.H.W.M. SCHUURS.- Immunoassay using haptenezyme conjugates.
FEBS Letters. **24**: 77-81, 1972.
- VAN WEEMEN, B.K. y A.H.W.M. SCHUURS.- The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labelled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassays.
Immunochemistry. **12**: 667-670, 1975.
- VAHOUNY, G.V., R. CHANDERBHAN, B.J. NOLAND, D. IRWIN, P. DENNIS, J.D. LAMBETH y T.J. SCALLEN.- Sterol carrier proteins. Identification of adrenal SCP and site of action for mitochondrial cholesterol utilization.
J. Biol. Chem. **258**: 11731-11737, 1983.
- VARNER, D.D., J. SCHUMACHER, T.L. BLANCHARD y L. JOHNSON.- Reproductive Anatomy and Physiology. En: Diseases and Management of Breeding Stallions, editado por P.W. Pratt. California: American Veterinary Publications, 1991, p:1-59

WALLACH, S.J.R., B.W. PICKETT y T.M. NETT.- Sexual behaviour, and serum concentration of reproductive hormones in impotent stallions.

Theriogenology. **19**: 833-840, 1983.

WEITZMAN, E.D., D. FUKUSHIMA, C. NOGEIRE, H. ROFFWARG, T.F. GALAGHER y L. HELLMAN.- Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects.

Endocrinology. **33**: 14-22, 1971.

WONG, C.C., K.D. DOHLER, M.J. ATKINSON y H. GEERLING, R.D. HESCH y A. VON ZUR MUHLEN.- Circannual variation in serum concentrations of pituitary, thyroid, parathyroid, gonadal and adrenal hormones in male laboratory rats.

J. Endocrinol. **97**: 179-185, 1983.

YANAGIBASHI, K., Y. OHNO, M. KAWAMURA y P.F. HALL.- The regulation of intracellular transport of cholesterol in bovine adrenal cells. Purification of a novel protein.

Endocrinology. **123**: 2075-2082, 1988.

YOUNG, M.W.- Molecular Genetics of Biological Rhythms. En: Cellular Clocks Series/4, editado por Marcel Dekker Inc., New York, 1992, p:336.

ZIRKIN, B.R., L.L. EWING, N. KROMANN y R.C. COCHRAN.- Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: Correlation with Leydig cell ultrastructure.

Endocrinology. **107**: 1867-1874, 1980.

ZOLOVICK, A. D.W. UPSON y B.E. ELEFThERIOU.- Diurnal variation in plasma glucocorticosteroid levels in the horse (*Equus caballus*).

J. Endocrinol. **35**: 249-253, 1966.

ZWAIN, I., J-L. GAILLARD, T. DINTINGER y P. SILBERZAHN.- Down-regulation of testicular aromatization in the horse.
Biol. Reprod. **40**: 503-510. 1989.